



Université d'Avignon et
des Pays de Vaucluse
74 rue Louis Pasteur
84029 Avignon cedex 1
Tél : +33 (0)4 90 16 25 00



CIRAD-PRAM
Quartier Petit Morne – BP 214
97285 Le Lamentin cedex 2
Tél : 05 96 42 30 00

Mémoire de Fin d'Etudes

Diplômes de Master 2 Sciences, Technologies, Santé _ Agrosiences

Spécialité : Gestion de la Qualité des Productions Végétales

Option : Phytoprotection

MISE EN EVIDENCE D'UNE REPONSE SYSTEMIQUE INDUITE

**Caractérisation de l'impact de cette résistance induite sur le contrôle des
populations de nématodes du bananier et de l'ananas**

Par : Laryssa SAULIA
(15 mars-16 septembre 2010)

Soutenu à Avignon, le : 16 septembre 2010

Maître de stage : Mr Alain SOLER, agronome

Tutrice : Mme Huguette SALLANON, responsable de formation

Remerciements :

Je tiens à remercier Mr Alain Soler, agronome responsable du laboratoire, de m'avoir permis de réaliser ce stage au sein de son équipe.

Mr Paul Alex Marie-Alphonsine, technicien supérieur en agronomie, pour son implication dans la mise en place de l'expérimentation et ses conseils précieux sur le terrain.

A Mlle Madlyn François-Haugrin et Karelle Romuald, assistantes ingénieur, pour leur implication dans la logistique du laboratoire et leur disponibilité.

Merci à Fabrice Vinatier pour son aide dans l'exploitation des analyses statistiques.

Grand merci aux autres stagiaires : Claudine Corbion et Soline Picard pour leur aide et leur bonne humeur.

Toute l'équipe du PRAM, en particulier, Patrick Quénéhervé, Cathy Mieville et à l'équipe nématologie, Serge Marie-Luce, Jules Hubervic et Christiane Mauriol-Bastol, qui nous ont aidée à réaliser la partie nématologie de l'étude.

Résumé :

Les végétaux ont développé divers mécanismes de défense pour survivre à la pression des bioagresseurs et des ravageurs naturels des plantes. La résistance systémique induite est une réponse mise en place par la plante après reconnaissance d'un éliciteur biotique non pathogène. Elle permet d'augmenter la capacité défensive de la plante par un effet priming, qui lui confère une sorte d'immunisation à une attaque ultérieure. L'utilisation de ces éliciteurs en agriculture, dans la protection des cultures, pourrait être une alternative intéressante à l'utilisation de produits chimiques. Plusieurs éliciteurs seront testés sur deux variétés d'ananas, la 'Cayenne lisse' et 'MD2', ainsi qu'une variété de bananier 'cv-902', en système de split-root afin de mettre en évidence une résistance systémique induite par ces plants. La caractérisation de l'impact de cette élicitation sur une population de nématodes rendra compte de la réponse de la plante et des effets possibles de l'induction d'une résistance systémique sur la plante.

Mots clés : *résistance systémique induite, éliciteur, bananier, ananas, nématodes.*

Abstract :

Plant have developed various defense mechanisms to survive the pressure of pests and natural pest plants. The induced systemic resistance is a response set up by the plant after recognition of a biotic elicitor nonpathogenic. It will increase the defensive capacity of the plant by a priming effect, which gives it a sort of immunization to a later attack. The use of these elicitors in agriculture, crop protection, could be an interesting alternative to the use of chemicals. Several elicitors will be tested on two varieties of pineapple, 'smooth Cayenne' and 'MD2', and a variety of banana 'CV-902, in split-root system in order to identify systemic resistance induced by these plants. The characterization of the impact of the elicitation of a population of nematodes will report on the response of the plant and the possible effects of induction of systemic resistance to the plant on controlling these pests.

Key words: *induced systemic resistance, elicitor, banana, pineapple, nematodes.*

Introduction :1

I. Matériels et méthodes :	5
1. Matériel biologique	5
a) Dispositif expérimental :	5
2. Expérimentation 1 : Mise en évidence d'une ISR chez le bananier et l'ananas en split root	5
1. Récolte des échantillons :	5
2. Extraction enzymatique (Annexe I):	6
3. Dosage de l'activité enzymatique par spectrophotométrie (Annexe II) :	6
a) Dosage de l'activité des PPOX :	6
b) Dosage de l'activité des Peroxydases (POD) :	7
c) Dosage de l'activité de la CAT :	7
d) Dosage de la LOX :	7
e) Dosage de la PAL :	7
f) Dosage de la SOD :	8
g) Dosage de la GST :	8
4. Expérimentation 2 : Mise en évidence de l'impact de l'ISR sur les populations de nématodes sur bananiers et ananas	8
a) Récolte des échantillons :	9
☐ Méthode de récolte des racines de bananier pour une estimation de la population de <i>Pratylenchus coffeae</i> (ANNEXE IV):	9
☐ Méthode de récolte des racines d'ananas pour une estimation de la population de <i>Rotylenchulus reniformis</i> (ANNEXE V):	9
II. Résultats et discussions :	11
1. Etude de l'impact des traitements sur la croissance des plants	11
a) Teneur relative en chlorophylle des plants mis en pots simple dans la serre :	11
b) Partie racinaire et partie aérienne des plants en pots simples de la serre :	12
2. Mise en évidence d'un impact des traitements sur la population de nématodes parasites des racines :	12
a) Chez le bananier 'cv-902' :	12
b) Chez l'ananas :	13
3. Mise en évidence d'une ISR par l'étude de l'impact des éliciteurs sur l'activité enzymatique d'enzymes impliquées dans les mécanismes de défense de la plante	14
a) Split-root bananier 'cv-902' :	14
b) Plants de bananiers 'cv-902' en serre :	15
c) 'Cayenne lisse' et 'MD2' en serre :	15

Conclusion :18

Liste des abréviations :

APX : ascorbate peroxydase

CAT : catalase

SAR : Résistance Systémique Acquise

ET : Ethylène

GST : Glutathio S-transférase

HR : Réaction Hypersensible

ISR : Résistance Systémique Induite

JA : Acide Jasmonique

Lam : Laminarine

LOX : lipoxygénase

MeJa : Méthyl Jasmonate

P : *Pontoscolex corethrurus*

PAL : phénylalanine-ammonia-lyase

PGPM : Plant Growth Promoting Microorganisms

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

POD : peroxydase

PPOX : polyphénoloxydase

PR : Pathogenesis Related

PVP : Polyvinylpolypyrrolidone

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

SA : Acide Salicylique

SDN : Stimulateur des Défenses Naturelles

SOD : super-oxyde dismutase

S : Stilfénia®

Tr : *Trichoderma harzanium*

Tables des illustrations:

- Figure 1: La résistance systémique induite chez les plantes par les PGPR (source :Jourdan E., 2008)
- Figure 2: Comparaison des deux formes de résistances induites chez la plante (source: Vallad G..E. et Goodman R.M., 2003)
- Figure 3: Modèle de réseau de transmission du signal impliqué dans la SAR stimulée par un pathogène avirulent et dans l'ISR stimulée
- Figure 4: système split-root bananier
- Figure 5 : Inoculation de *Pratylenchus coffeae* des plants de bananiers en serre
- Figure 6 : Cycle biologique de *Pratylenchus sp.* (source : Agrios G. N., 2004)
- Figure 7 : Racines de bananiers sur tamis entreposés dans la chambre à brouillard
- Figure 8 : Tableau récapitulatif ANOVA pour les teneurs en chlorophylle chez le bananier (logiciel R)
- Figure 9 : Etat de la population de *Rotylenchus reniformis* sur Cayenne lisse et MD2 en serre, après
- Figure 10 : Etat de la population de *Pratylenchus coffeae* sur bananier 902 en serre, après
- Figure 11 : graphes des activités enzymatiques des différentes enzymes dosées en fonction des traitements éliciteurs appliqués sur la partie traitée des split-root de bananier
- Figure 12: graphes des activités enzymatiques des différentes enzymes dosées en fonction des traitements éliciteurs appliqués sur les plants de bananiers (pot simple)
- Figure 13: graphes des activités enzymatiques des différentes enzymes dosées en fonction des traitements éliciteurs appliqués sur les plants de la variété Cayenne lisse
- Figure 14: graphes des activités enzymatiques des différentes enzymes dosées en fonction des traitements éliciteurs appliqués sur les plants de la variété MD2 (pot simple)
- Figure 15 : Résumé données 902

- Graphe 1 : Données sur la teneur relative en chlorophylle, en fonction des différents traitements éliciteurs, chez les trois variétés de plants mis en serre
- Graphe 2 : Comparaison des masses de la partie racinaire entre les différents traitements chez MD2
- Graphe 3 : Comparaison des masses de la partie racinaire entre les différents traitements chez la Cayenne lisse
- Graphe 4 : Comparaison des masses de la partie aérienne entre les différents traitements chez la Cayenne lisse
- Graphe 5 : Comparaison des masses de la partie aérienne entre les différents traitements chez MD2
- Graphe 6: Comparaison des masses de la partie aérienne entre les différents traitements chez le bananier
- Graphe 7: Comparaison des masses de la partie racinaire entre les différents traitements chez le bananier

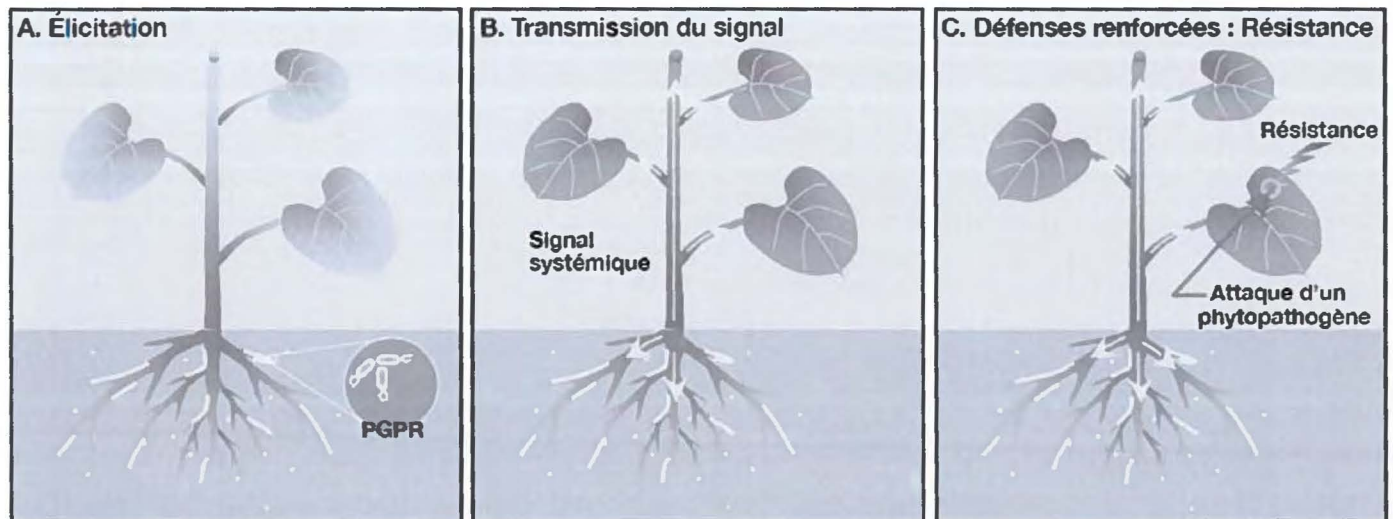


Figure 1 : La résistance systémique induite chez les plantes par les PGPR (source : Jourdan E., 2008)

A : élicitation, les PGPR interagissent avec les racines de l'hôte et produisent des éliciteurs qui sont perçus par la plante

B : un signal est véhiculé dans l'ensemble de la plante afin de l'alerter

C : lors d'une éventuelle attaque par un agent pathogène, la plante sera en mesure de répondre plus efficacement à l'agression, elle devient résistante.

Introduction :

L'étude repose sur la mise en évidence d'une résistance systémique induite par élicitation dans le contrôle de la population de nématodes parasites, chez deux espèces végétales, le bananier et l'ananas. Plusieurs éliciteurs seront testés ; leurs impact sur la synthèse de différentes protéines enzymatiques, impliquées dans les mécanismes de défense de la plante, démontrera l'activation d'une réponse systémique induite par le végétal. L'expérimentation se divise en deux parties : une partie « essai en serre » avec inoculation de nématodes, où l'effet des divers traitements sur la population de nématodes inoculés et sur la synthèse protéique racinaires seront étudiés, et une partie « split-root » où l'effet systémique sera démontré.

L'expérimentation est dirigée par Mr Alain Soler, agronome responsable du laboratoire d'agrophysiologie appartenant à l'UR26 : Systèmes de culture Bananes, Plantains et Ananas, qui s'insère dans le département PERSYST du CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement). Le site du Pôle de Recherche Agro-environnemental de la Martinique (PRAM) regroupe plusieurs organismes dont le CIRAD, l'IRD (Institut de Recherche et Développement) et le CEMAGREF (Centre du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et Forêts). Le principal objectif du PRAM est de contribuer au développement durable et solidaire de la Martinique et de la Caraïbe. Il tente d'offrir des réponses au double défi d'une prise en compte de l'environnement et du renouveau de l'agriculture dans un milieu insulaire tropical riche d'une biodiversité remarquable, mais marqué par de fortes contraintes. Les principaux domaines étudiés au PRAM sont la pédologie, la phytopathologie, la nématologie, la biochimie, la physiologie des fruits après récoltes. Notre étude axée sur la résistance systémique induite englobe les domaines de la phytopathologie, la nématologie et la biochimie.

La résistance systémique peut être définie comme l'augmentation des capacités de défense des plantes face à une large gamme de bioagresseurs. Elle est acquise après une stimulation appropriée (Ramamoorthy et al., 2001). Il existe deux types de résistances systémiques. La résistance systémique acquise (SAR) est généralement activée par des

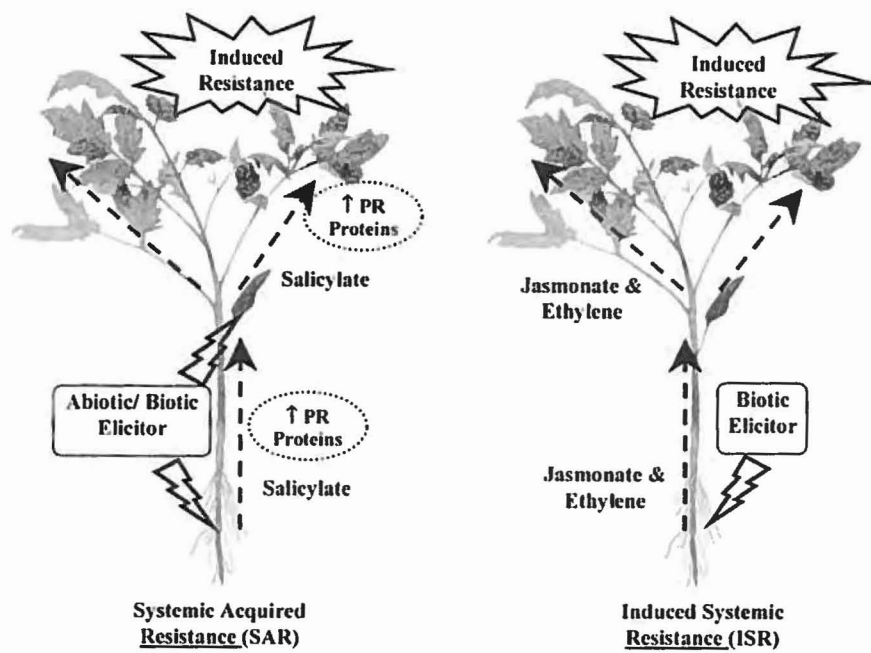


Figure 2 : Comparaison des deux formes de résistances induites chez la plante
(source :Vallad G.E. et Goodman R.M., 2003)

pathogènes nécrotiques mais peut être aussi induite suite au traitement par des molécules purifiées issues d'autres pathogènes et par certains composés synthétiques (acide salicylique, acide β -acibenzolar-S-methyl-benzothiadiazole) (Sticher et al., 1997). La résistance conférée par ce phénomène persiste dans le temps et est effective sur une multitude de plantes et ainsi que le montre un large spectre de pathogènes incluant virus, bactéries, champignons et nématodes. L'effet protecteur conféré par la SAR est phénotypiquement similaire à un autre phénomène déclenché suite à l'interaction avec un microorganisme non pathogène. Cette « immunisation » de la plante, ne provoque pas de symptômes visibles de maladie, on parle de résistance systémique induite (ISR) (Van Loon et al., 2005). L'ISR s'est avérée être induite par des microorganismes variés et plus particulièrement par des Rhizobactéries qui peuvent avoir d'autres effets bénéfiques sur la croissance, on parle de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Ramamoorthy et al., 2001). Dans l'ensemble, les bactéries ayant un impact positif sur la plante, par le biais d'un effet protecteur ou via une stimulation de sa croissance, ont communément été regroupées sous le terme de PGPM (Plant Growth Promoting Microorganisms). La bibliographie, concernant les réponses mises en place par la plante et induites par des microorganismes, est restreinte contrairement à celles provoquées par l'attaque de pathogènes. Néanmoins, l'ISR peut être divisée en trois étapes principales que sont :

- la perception des molécules actives produites par le PGPR/PGPM ou élicitation
- la transmission d'un signal systémique dans la plante
- et l'expression des mécanismes de défense de l'hôte (Ongena et al., 2006) (Cf. fig 1).

Les voies de signalisation de l'état induit chez les plantes sont régulées par trois molécules signalétique, l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET). Des études menées sur des plants de tabac ont montré que, suite à une inoculation du virus de la mosaïque du tabac (TMV), la réaction hypersensible observée était causée par une forte augmentation de la concentration de SA (Yalpani et al., 1993). Dans la reconnaissance du pathogène, SA serait donc la molécule « signal » permettant la propagation de la résistance induite dans la plante entière. L'induction de la SAR exige la synthèse de SA, cette dernière s'accumule dans les plantes avant l'apparition de la SAR (Dong X., 1998). SA jouerait aussi un rôle dans l'ISR ; des observations sur plants de tabac préalablement traités, avec un PGPR ou un PGPM avant d'être infectés par un pathogène, indiqueraient que l'accumulation de SA jouerait un rôle dans l'ISR mise en place contre la maladie inoculée (Zhang S. et al., 2002). Autre médiateur chimique mis en cause dans la réponse des plantes aux bioagresseurs : JA. Il

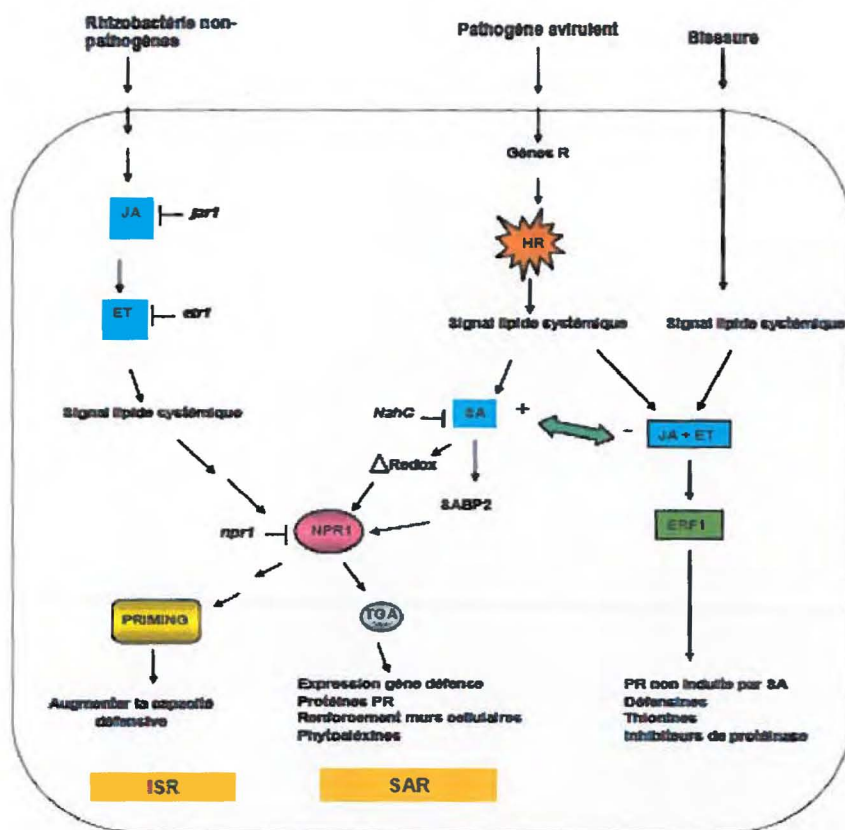


Figure 3 : Modèle de réseau de transmission du signal impliqué dans la SAR stimulée par un pathogène avirulent et dans l'ISR stimulée par une rhizobactérie non-pathogène (Adam A., 2008)

est établi que la réponse au JA par la plante induit une résistance à un large éventail d'insectes ravageurs (Thaler J.S et al., 2004). La figure 2 illustre l'action de chaque molécule de signalisation dans l'induction d'une résistance induite et acquise : JA et ET sont impliqués dans l'activation de l'ISR et la SA dans la mise en place de la SAR par la plante (Gary E. et Goodman M.R, 2003). Néanmoins, il existerait une interaction entre la voie salicylate et la voie jasmonate, ces deux dernières n'évolueraient pas indépendamment l'une de l'autre comme le montre la figure 3. Une autre approche, moins sectaire, rend compte d'une interaction plus dynamique (Cf. fig. 3) avec un contrôle positif de JA sur SA et négatif de SA sur JA, pour ce qui est de l'induction de la voie jasmonate par une blessure.

Cependant, la conséquence d'une synthèse accrue de SA et JA dans la plante s'avère être identique : cette augmentation s'ensuit d'une rapide et forte production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) toxiques (Bolwell G.P., 1999). Les ROS sont impliquées dans de nombreux processus liés à la pathologie des plantes, leur production est une importante composante de la réponse cellulaire à divers stress dont les attaques de pathogènes. L'activation de plusieurs cascades de réactions, par SA, JA et les ROS, contribue à la mise en places de divers mécanismes de défense par la plante : renforcement des parois cellulaires, mort cellulaire (HR), synthèse de phytoalexines, synthèse d'enzymes hydrolytiques, activation de protéases et de nucléases, ect. La modulation de la synthèse des protéines enzymatiques impliquées dans la synthèse des molécules « signal », dans la synthèse de ROS et dans la protection des cellules de la plante de ces ROS toxiques seront les marqueurs d'une résistance systémique. L'étude se focalise sur huit enzymes de défense :

- LOX (lipoxygénase) impliquée dans la synthèse de JA et de molécules précurseur de composés dérivés

- hydroxy et époxy à propriétés fongitoxiques (Akram A. et al., 2008) ;

- POD (peroxydase), APX (ascorbate peroxydase) et CAT (catalase) sont des enzymes antioxydantes qui réduisent au minimum les effets dommageables des radicaux libres en dégradant le peroxyde d'hydrogène en molécule(s) non toxiques pour la plante (Miller et al., 2008) ;

- PAL (phénylalanine-ammonia-lyase) impliquée dans la synthèse de SA et dont l'activité est directement liée à la quantité de composés phénoliques (Kapoor R., 2008) ;

- SOD (super oxyde dismutase) qui catalyse la formation du peroxyde d'hydrogène.

- GST (glutathion S-transférase) qui est un biomarqueur de stress, elle permet la dégradation des xénobiotiques et du peroxyde d'hydrogène ;

- PPOX (polyphénoloxydase) agit dans la résistance en hydroxylant des monophénols en o-diphénols et en oxydant ces composés en quinones, qui sont plus souvent toxiques aux microorganismes que les composés phénoliques d'origines (Gandia-Herrero et al., 2005).

Plusieurs éliciteurs sont testés afin de dégager les meilleurs candidats pouvant impacter positivement la synthèse des huit enzymes énumérées précédemment. Les éliciteurs sont des substances capables de provoquer des réactions de défense chez les végétaux, qui sécrètent alors des molécules s'opposant à l'implantation ou au développement d'agents pathogènes. Parmi la liste exhaustive d'éliciteurs qui existent à l'heure actuelle, quatre éliciteurs, un PGPR et un organisme vivant ont été retenus. Tout d'abord SA et le méthyl jasmonate (MEJA), dont l'action dans les mécanismes de défense ont été traités en amont. *Trichoderma harzanium* (Tr) dont plusieurs souches ont été développés comme agents pathogènes de lutte biologique contre certaines maladies fongiques (Khan et al., 2004). Le Stifenin® (S), composé à base de graines de fenugrec, est un stimulateur des défenses naturelles (SDN) ; son efficacité contre l'oïdium sur cépages sensibles à cette maladie a été démontrée (Martinez C. et Clergue T., 2006). La laminarine Iodus 40® (LAM) provenant de l'algue *Laminaria digitata* est aussi considéré comme étant un SDN. Un organisme vivant du sol, *Pontoscolex corethrurus* (P), communément appelé ver de terre, aurait des effets la diminution des dommages occasionnés par les nématodes sur bananiers (Lafont A. et al., 2007).

L'étude a deux objectifs principaux :

- 1) mise en évidence d'une ISR par élicitation, avec un éliciteur ou la combinaison d'éliciteurs, par l'intermédiaire de dosages des huit enzymes impliquées dans les mécanismes de défense afin d'isoler un ou plusieurs biomarqueurs de cette éventuelle ISR,
- 2) mise en évidence de l'impact des traitements sur les populations de nématodes.

L'expérimentation, divisée en deux parties avec des conditions de cultures différentes, est réalisée sur une variété de bananier et deux variétés d'ananas. Les plants seront traités avec différents traitements : SA, MEJA, *Trichoderma harzanium* (Tr), Stifenin® (S), laminarine (LAM), *Pontoscolex corethrurus* (P), S + Tr + P et un traitement Eau (témoin). Le dosage des huit enzymes (LOX, POD, PAL, SOD, APX, GST, PPOX et CAT) permettra de mettre en évidence l'ISR et l'éliciteur mis en cause. En ce qui concerne la mise en évidence de la SDN sur les populations de nématodes, deux variétés seront étudiées : *Pratylenchus coffeae* sur banane, et *Rotylenchulus reniformis* sur ananas.

Tableau 1 : Fiches botaniques des variétés utilisées dans l'étude




Variété bananier	Variétés ananas	
		
Famille : Musaceae Genre : Musa Section : Eumusa Espèce : <i>Musa Acuminata</i> (AA) Sous-groupe : <i>Cavendish</i> (AAA) Cultivar : 'cv-902'	Famille : Bromeliaceae Genre : Ananas Espèce : <i>Ananas comosus</i> Cultivar : 'MD2'	Famille : Bromeliacea Genre : Ananas Espèce : <i>Ananas comosus</i> Cultivar : 'Cayenne lisse'

Tableau 2 : Traitements réalisés sur la partie traitée du split-root

Traitements et concentrations	Concentrations	Dose administrée/pot
SA	1 mM	20 ml
MeJa	0,1 mM	20 ml
Lam (Iodus 40®)	20 g/L	20 ml
S	20 g/L	20 ml
Tr (Triatum P-wG®)	0,3 g	
P	5 vers de terre pour le 1 ^{er} traitement puis 3 vers de terre pour les suivants	



Figure 4 : Système split-root bananier

I. Matériels et méthodes :

1. Matériel biologique

Les travaux ont été effectués sur trois variétés. Une variété de bananier, la Cavendish cv-902 et deux variétés d'ananas : la Cayenne lisse et la MD2 (Cf. tab.1).

a) Dispositif expérimental :

Deux expérimentations (expérimentation 1 et expérimentation 2) sont réalisées en parallèle, avec des conditions et des modalités de culture différentes.

L'irrigation se fait par aspersion automatisée, 4 irrigations de 3 min (8h30, 12h30, 15h30 et 17h30). Elle a été modulée en fonction des besoins de l'expérimentation, notamment après l'inoculation des pots simples pour éviter l'effet de lessivage que pourrait occasionner un excès d'eau et donc une perte des nématodes inoculés.

2. Expérimentation 1 : Mise en évidence d'une ISR chez le bananier et l'ananas en split root

Les jeunes plants de bananiers proviennent de vitro-plants ayant subits une phase d'acclimatation en pépinière. Ils ont été replantés dans un système de double pot (Cf. fig.4) avec de la terre préalablement stérilisée. Le même procédé a été effectué sur les ananas avec des rejets de pied mère provenant de la serre du PRAM. Faute de chambre de culture disponible, les split-root bananiers ont été placés dans une pièce près des fenêtres, tandis que les split-root ananas ont pu être mis en chambre de culture. Chaque double pot est recouvert d'une toile servant à limiter tout type de contamination et comporte une partie non traitée et une partie traitée. Les 8 traitements éliciteurs s'effectuent tous les 5 jours pendant 15 jours, soit 3 traitements au total. Il y a 7 répétitions par traitements pour les bananiers et 6 répétitions par traitements et par variétés pour les ananas (Cf. tab. 2).

1. Récolte des échantillons :

Seule la variété banane a été récoltée, le système racinaire des ananas n'étant pas assez dense la période de traitements a été repoussée dans le calendrier de l'expérimentation.

Tableau 3 : Quantités de substrats et de réactifs des cuves blanc et cuve à essai pour chaque dosage enzymatique

Enzymes	Cuve blanc	Cuve essai
LOX	-2,9 ml de tampon phosphate A	-2,9 ml de tampon phosphate A -50 µl d'extrait végétal
POD	-2,3 ml de tampon citrate 0,2 M, pH 5 contenant du gaïacol à 69 mM -500 µl d'H ₂ O ₂ -200 µl d'eau distillée	-2,3 ml de tampon citrate 0,2 M, pH 5 contenant du gaïacol à 69 mM -500 µl d'H ₂ O ₂ -200 µl d'extrait pur dilué au 1/10 ^e ou 1/100 ^e
PAL	-2,75 ml de tampon borate à 0,1 M, pH 8,8 -250 µl d'eau distillée	Cuve essai : -2,75 ml de tampon borate à 0,1 M, pH 8,8 contenant 60 mM de L-phénylalanine -250 µl d'extrait végétal Cuve témoin -2,75 ml de tampon borate à 0,1 M, pH 8,8 -250 µl d'extrait végétal
SOD	-2,4 ml de réactif au NBT -0,6 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,8	-2,4 ml de réactif au NBT -x ml de solution de xanthine-oxydase diluée (~0,1 ml de solution) -(0,6-x) ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,8
APX	-2,45 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7 -145 µl d'acide ascorbique à 0,5 mM -300 µl d'eau distillée -200 µl d'extrait végétal	-2,45 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7 -145 µl d'acide ascorbique à 0,5 mM -300 µl d' H ₂ O ₂ à 0,5 mM -200 µl d'extrait végétal
GST	-1 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7 -20 µl de CDNB 100 mM -20 µl de GSH 100 mM	-0,5 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7 -0,5 ml d'extrait végétal -20 µl de CDNB 100 mM -20 µl de GSH 100 mM
PPOX	-2,7 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8 -300 µl de pyrocathécol à 50 mM	-2,5 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8 -300 µl de pyrocathécol à 50 mM -200 µl d'extrait végétal
CAT	-2,5 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7 -300 µl d'eau distillée -200 µl d'extrait végétal	-2,5 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7 -300 µl d' H ₂ O ₂ à 0,34 M -200 µl d'extrait végétal

Cinq jours après la date du dernier traitement, les racines des plants de bananiers sont récoltées : elles ont été rincées, afin de les débarrasser au maximum de la terre et en évitant les pertes de racines, puis séchées à l'aide de papiers absorbants et enfin conservées dans des sachets plastiques identifiés au congélateur à -20°C. Les racines et le matériel végétal aérien ont été pesés. Ainsi, pour la variété cv-902 on dispose de 7 lots/traitements (un lot correspondant à un plant), chacun des lots comportant une partie racinaire traitée et une partie racinaire non traitée. Les dosages enzymatiques sont réalisés sur les racines non traitées.

2. Extraction enzymatique (Annexe I):

L'extraction enzymatique est immédiatement suivie des dosages enzymatiques pour limiter au maximum toutes pertes d'activités enzymatiques de certaines enzymes.

Le protocole d'extraction enzymatique à partir de racines de bananier et d'ananas a été élaboré après une recherche bibliographique (Wuyts et al., 2006, Neves et al., 2007, Damodaran et al., 2009). Dans un lot, 2,5 g de racines ont été récupérés puis découpés en petits morceaux pour faciliter le broyage au broyeur mécanique à mortier dans une solution d'extraction (20 ml de solution tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,1 M, pH 6,8) contenant 5% de Polyvinylpyrrolidone (PVP) et 0,20% de Tween 20). L'extraction a été faite à basse température pour éviter que les protéines enzymatiques ne se dénaturent. Le broyat a été ensuite centrifugé à 4°C pendant 30 min à 14 000 rpm. Le surnageant a été ensuite récupéré et maintenu dans de la glace. Il a été filtré sous vide, conditionné dans un pot à usage unique, clairement identifié et enveloppé dans de l'aluminium pour éviter l'oxydation des polyphénols à la lumière.

3. Dosage de l'activité enzymatique par spectrophotométrie (Annexe II) :

La réalisation des cuves « blanc » et des cuves « essai » pour chaque dosage enzymatique est indiquée dans le tableau 3. Pour une variété, quatre lots sont analysés avec deux répétitions par lot.

a) Dosage de l'activité des PPOX :

Le protocole de mesure a été mis au point à partir des méthodes de Mayer et al., 1965 et Avallone et al., 2003. Ces enzymes transforment les composés phénoliques en produits

quinones. Dans notre cas, le substrat utilisé est le pyrocathécol est oxydé en o-Quinone. La cinétique a été suivie au spectrophotomètre double faisceau et l'activité est donnée en $A_{420} \cdot \text{min}^{-1}$.

b) Dosage de l'activité des Peroxydases (POD) :

Le protocole de mesure des POD a été inspiré de la méthode mise en place par Hammerschmidt et al., 1982. Ces enzymes oxydent les phénols en présence de peroxyde d'hydrogène. La cinétique de la réaction a été suivie au spectrophotomètre simple faisceau et l'activité est donnée en $A_{470} \cdot \text{min}^{-1}$.

Dosage de l'activité de l'APX :

Le protocole de mesure de l'APX a été défini à partir de la méthode de Schoener et al., 1990, modifiée par Zhou et al., 2002. L'activité de cette enzyme est déterminée en mesurant la réduction de l'acide ascorbique en ascorbate, en présence de peroxyde d'hydrogène. L'activité a été suivie au spectrophotomètre à double faisceau et l'activité est donnée en $A_{209} \cdot \text{min}^{-1}$.

c) Dosage de l'activité de la CAT :

De même que pour l'APX, le protocole de mesure de l'activité de la CAT a été mis au point à partir de la méthode de Schoener et al., 1990. La décomposition du peroxyde d'hydrogène par la catalase est suivie au spectrophotomètre.

d) Dosage de la LOX :

Le protocole de mesure est inspiré de la méthode utilisée au PARM (Pôle Agroalimentaire de la Région Martinique). L'étude de la cinétique enzymatique de la LOX est réalisée grâce au suivi de la transformation de l'acide linoléique, l'activité est donnée en $A_{234} \cdot \text{min}^{-1}$ au spectrophotomètre simple faisceau.

e) Dosage de la PAL :

La mesure de l'activité de la PAL est réalisée selon la méthode de Hodgins et al., 1970 et d'après une méthode décrite par Martinez et al., 1996, modifiée par Zhou et al., 2003. Elle consiste à mesurer la quantité d'acide cinnamique libérée lors de la réaction de l'enzyme avec son substrat. La DO est mesurée en lecture simple à 290 nm.



Figure 5 : Inoculation de *Pratylenchus coffeae* des plants de bananiers en serre

Tableau 4 : Organisation des inoculations et des récoltes des bananiers en serre

Traitements	Nombre de plants non inoculés	Nombre de plants inoculés
P	4	7
TR	4	7
S	4	7
P+TR+S	4	7
SA	4	7
MeJa	4	7
Lam	4	7
Eau	4	7
Inoculation	(pas d'inoculation)	15 jours après le 1 ^{er} traitement éliciteur
Récolte	15 jours après le 1 ^{er} traitement	45 jours après l'inoculation

f) Dosage de la SOD :

Le substrat (O_2^-) de la SOD est très instable et a une durée de vie très courte. Les méthodes de dosage sont donc indirectes. Le protocole de mesure a été mis au point d'après la méthode de Deschamps et al., 1971, modifiée par Oberley et al., 1985. Il évalue la SOD par sa capacité à inhiber un flux d'anion superoxyde

(O_2^-) généré par le système Xanthine-Xanthine Oxydase. Les radicaux superoxydes produits par ce système réduisent le nitrobleu de tétrazolium (NBT) en bleu de formazan stable à 560 nm.

g) Dosage de la GST :

La mesure de l'activité enzymatique de la GST a été inspirée de la méthode de Habig et al., 1974. La GST catalyse une réaction de transfert du glutathion réduit (GSH) sur le CDNB (1-Chloro-2,4-Dinitrobenzène). Le produit de cette réaction absorbe à 340 nm, on visualise donc sa formation par spectrophotométrie pendant 10 min, dans des micro-cuves.

4. Expérimentation 2 : Mise en évidence de l'impact de l'ISR sur les populations de nématodes sur bananiers et ananas

Pour les deux espèces végétales, les plants sont en pot simple et sont aussi recouvert d'une toile protectrice. Le dispositif compte 88 plants/variété. La série est divisée en deux parties : une partie « pots traités-non inoculés » (4 répétitions/traitement) et une autre partie « pots traités-inoculés » (7 répétitions/traitement).

L'inoculation est réalisée avec deux espèces de nématodes : *Rotylenchulus reniformis* inoculés sur l'ananas et *Pratylenchus coffeae* sur bananier. Sur les variétés d'ananas 3 ml de suspension de *R. reniformis* ont été ajoutés dans les pots au niveau de deux trous opposés de 2 cm de profondeur, soit environ 5 000 nématodes/pot. La méthode est répétée sur les bananiers avec 5 ml de suspension de *P. coffeae*, soit une densité de 5 100 nématodes/pot (Cf. fig. 5 et

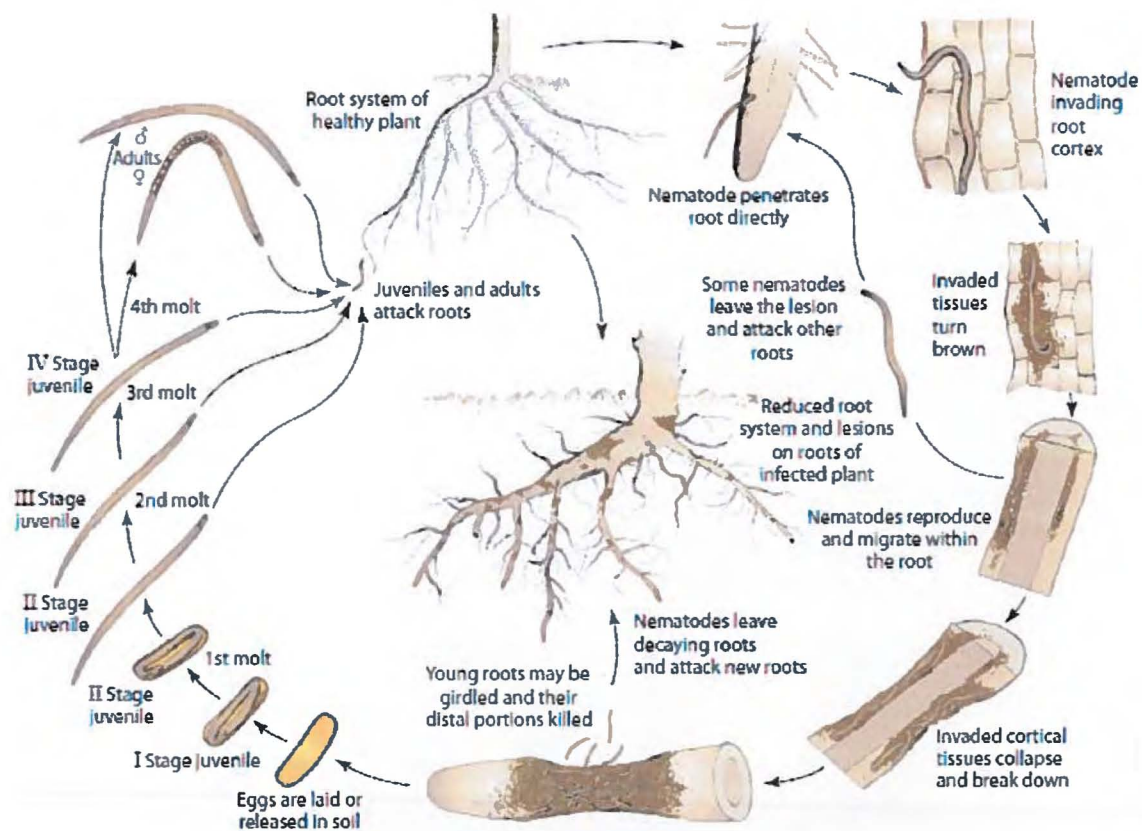


Figure 6 : Cycle biologique de *Pratylenchus* sp. (source : Agrios G. N., 2004)



Figure 7 : Racines de bananiers sur tamis entreposés dans la chambre à brouillard

Tab.4).La concentration en chlorophylle a été mesurée sur les feuilles d'ananas et de bananiers, 48 jours après le dernier traitement, à l'aide du Spad-502.

a) Récolte des échantillons :

Pour une variété, les quatre répétitions de plants traités non inoculés ont été récoltées 15 jours après la date du premier traitement. Le mode opératoire précédemment cité, pour le prélèvement des racines, est répété pour cette expérimentation. Il a été obtenu 4 lots de plants en serre non inoculés par traitement. Quant à la récolte des plants inoculés, la démarche s'avère être différente des plants inoculés. De plus, le mode opératoire est spécifique d'une espèce.

- Méthode de récolte des racines de bananier pour une estimation de la population de *Pratylenchus coffeae* (ANNEXE IV):

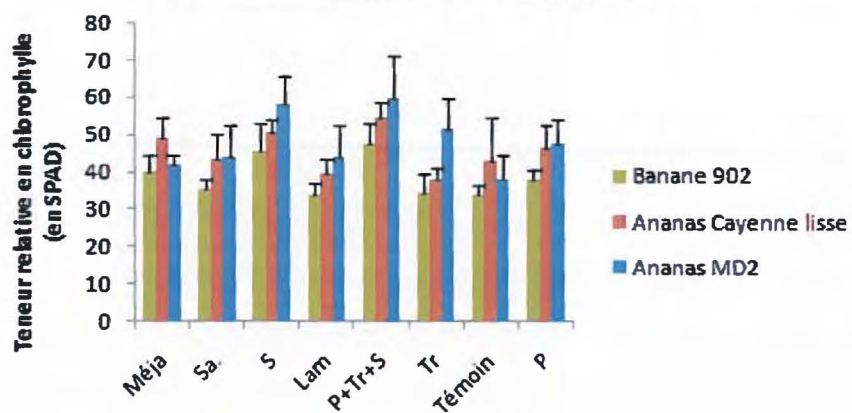
P. coffeae est un nématode parasite de l'ananas. Il s'agit d'un endoparasite (cf. fig. 6) qui parasite le cortex racinaire. L'extraction et la récupération de ces nématodes requiert une technique de prélèvement de racines de bananier précise développée par le Conseil de groupement du PRAM. Les plants de bananiers ont été récupérés à la serre, déposés, les racines lavées à l'eau, coupées en petits morceaux, sommairement séchées puis pesées. Les racines ont été déposées sur un tamis à toile de moustiquaire et placées sur un entonnoir équipé à son extrémité d'un tuyau d'une dizaine de centimètre. L'ensemble du dispositif a été placé sur un flacon de 500 ml équipé d'un trop plein de surface sur le support adapté dans la chambre à brouillard (2 min de brouillard, 3 min de ressuyage) (fig. 7). Au bout de 10 jours, le flacon contenant la suspension en nématodes a été récupéré avec son numéro d'échantillon. Après 2 h de sédimentation, le trop-plein des flacons a été pompé délicatement à l'aide d'une trompe à vide et la suspension de nématodes a été transférée directement dans un tube gradué de 100 ml avant de procéder au comptage sur un aliquote de la solution désirée. Lors du comptage, un bulleur a été mis dans le tube pour remettre en suspension les nématodes. Ces derniers ont été comptés dans une cellule de comptage de 1 ml sous microscope optique.

- Méthode de récolte des racines d'ananas pour une estimation de la population de *Rotylenchulus reniformis* (ANNEXE V):

R. reniformis est un semi-endoparasite qui parasite le système racinaire de l'ananas et se trouve dans la gaine de terre entourant les racines. La technique d'isolation de ces nématodes consiste à récupérer des nématodes contenus dans la terre qui entoure les racines après

l'arrachage du plan. Le plant dépoté a été secoué afin de faire tomber la grosse terre. Les racines ont été récupérées avec la gaine de terre puis ont été pesées. Les racines ont ensuite été lavées dans une passoire posée sur un seau pour libérer la gaine de terre. L'opération peut être répétée plusieurs fois, jusqu'à l'obtention d'une eau presque claire. Les racines sommairement séchées sur du papier absorbant ont été pesées (par différence de pesée on obtiendra le poids de la gaine de terre pour les calculs). Le surnageant des différents seaux a été passé sur une colonne de tamis rangés de bas en haut (25, 32, 50, 80, 50, 250 μ). Le contenu des tamis 80, 50, 32 et 25 a été récupéré dans un godet de centrifugation. Une procédure d'extraction de nématodes a été réalisée sur le godet par centrifugation flottaison. Trois cuillères à café de KAOLIN ont été rajoutées dans le godet de centrifugation et la suspension a été homogénéisée à l'aide du vibro-mélangeur. Les godets, équilibrés 2 à 2 sur la balance, ont été centrifugés à 3000 tours/min pendant 5 min. Le surnageant composé d'eau a été jeté et 200 ml de sulfate de magnésium ont immédiatement été ajoutés. Cette opération a été réalisée rapidement car les nématodes supportent mal la pression osmotique du sulfate de magnésium. Le culot a été remis en suspension avec le vibro-mélangeur et les godets ont été équilibrés 2 à 2 sur la balance. Après une seconde centrifugation de 5 min à 3000 tours/min, le surnageant a été placé sur un tamis de 5 μ m préalablement mouillé. Le tamis a été laissé en place quelques minutes afin de récupérer le sulfate de magnésium. En l'inclinant légèrement, il a été lavé avec un jet d'eau faible par-dessus et par-dessous. Le contenu du tamis a été récupéré dans un tube gradué de 50 ml à l'aide d'une pissette d'eau. Au moment de compter, les nématodes ont été remis en suspension grâce à un bulleur placé dans le tube. Le comptage a été réalisé sur un volume de 1 ml dans une cellule de comptage.

**Teneur relative en chlorophylle en fonction des
différents traitements chez chaque variété**



**Graphe 1 : Données sur la teneur relative en chlorophylle, en fonction
des différents traitements éliciteurs, chez les trois variétés de plants mis en serre.**

II. Résultats et discussions :

Toutes les données obtenues pendant l'étude ont fait l'objet d'une étude statistique à l'aide du logiciel R afin de déterminer si oui ou non il y a eut un impact significatif des traitements, un effet répétition et/ou un effet variété sur les données expérimentales obtenues (Annexe II).

1. Etude de l'impact des traitements sur la croissance des plants

a) Teneur relative en chlorophylle des plants mis en pots simple dans la serre :

Le graphe 1 donne les teneurs relatives en chlorophylle pour chaque traitement et chaque variété. L'étude statistique (Annexe VI) sur les données numériques des teneurs en chlorophylle chez la Banane 'cv-902' indique que la distribution des fréquences suit une loi normale. Le test de normalité de Shapiro-Wilkinson ainsi que le QQ-plot renforcent cette affirmation. Une ANOVA peut donc être réalisée :

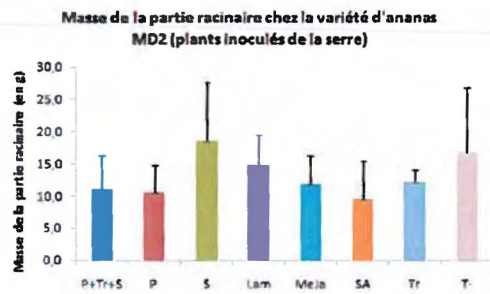
	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				55		2406.74	
traitement	7	1433.72		48		973.02	2.063e-12 ***
répétition	6	103.88		42		969.14	0.5413

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1							

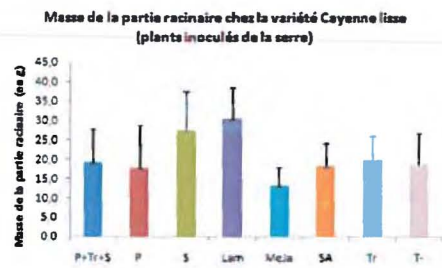
Figure 8 : Tableau récapitulatif ANOVA pour les teneurs en chlorophylle chez le bananier (logiciel R)

La p-value de « l'effet traitement » est inférieure à 0,05 et celle de « l'effet répétition » est supérieure à 0,05. On peut donc conclure, que pour les teneurs relatives en chlorophylle chez le bananier, il y a un effet traitement significatif et qu'il n'y a pas d'effet répétition significatif. Chez le bananier les traitements qui montrent une teneur en chlorophylle nettement supérieure au témoin sont : S et P+Tr+S. Le traitement MeJa a aussi une teneur supérieure à celle du témoin, mais cette élévation reste moins marquée que pour les deux autres traitements. En ce qui concerne les ananas : l'étude statistique indique qu'il y a un effet traitement, qu'il n'y a pas d'effet répétition et pas d'effet variété sur les données obtenues.

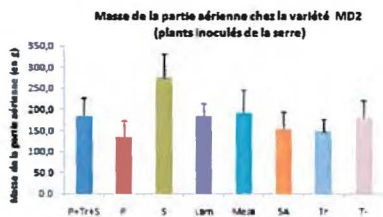
Pour l'ananas 'Cayenne Lisse', les valeurs sont plus élevées que le témoin pour quatre traitements, qui sont par ordre d'importance : P+Tr+S, S, MeJa et P. 'MD2' présente des teneurs supérieures à 'Cayenne lisse' ; les traitements P+Tr+S et S sont les plus élevés que le témoin suivis de P et Tr.



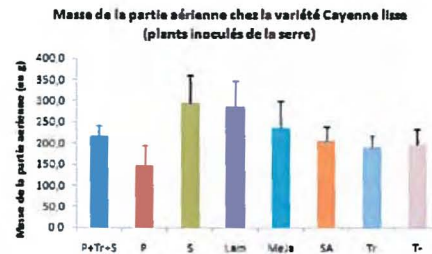
Graphe 3 : Comparaison des masses de la partie racinaire entre les différents traitements chez la Cayenne lisse



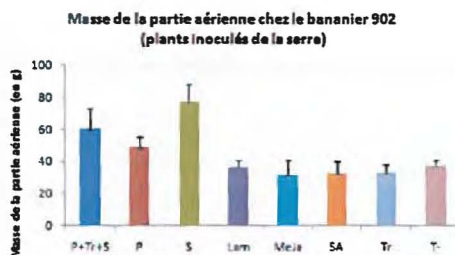
Graphe 2 : Comparaison des masses de la partie racinaire entre les différents traitements chez MD2



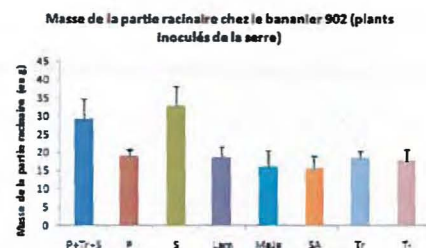
Graphe 4 : Comparaison des masses de la partie aérienne entre les différents traitements chez la Cayenne lisse



Graphe 5 : Comparaison des masses de la partie aérienne entre les différents traitements chez MD2



Graphe 7 : Comparaison des masses de la partie racinaire entre les différents traitements chez le bananier



Graphe 6 : Comparaison des masses de la partie aérienne entre les différents traitements chez le bananier

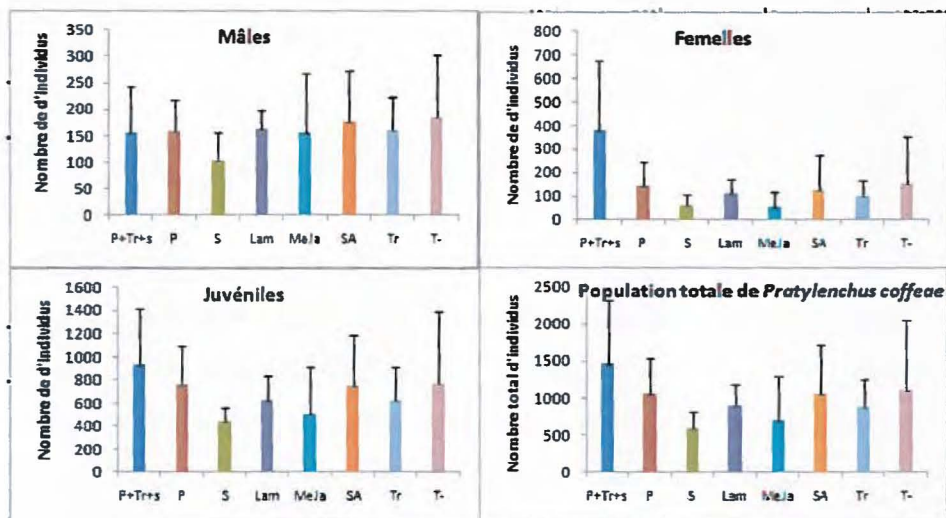


Figure 9 : Etat de la population de *Rotylenchus reniformis* sur Cayenne lisse et MD2 en serre, après élicitation et inoculation de nématodes

b) Partie racinaire et partie aérienne des plants en pots simples de la serre :

Les graphes 2 à 7 illustrent les masses des parties racinaires et des parties aériennes, relevées sur le bananier 'cv-902' et les deux variétés d'ananas, pour chaque traitement. Pour les trois variétés, les données massiques des parties aériennes et des parties racinaires suivent les mêmes tendances au sein d'un même traitement. En ce qui concerne le bananier (graphes 6 et 7) : les statistiques montrent qu'il y a un effet traitement et pas d'effet répétition sur les résultats obtenus. Les traitements qui présentent à la fois une augmentation de la masse des parties racinaires et des parties aériennes sont S et P+TR+S. Chez l'ananas, les différences entre la 'Cayenne lisse' (graphes 3 et 5) et 'MD2' (graphe 2 et 4), illustrent un effet variété qui est démontré par l'ANOVA. La 'Cayenne' possède en moyenne un système racinaire et aérien plus important. Les traitements S et LAM sont ceux pour lesquels les valeurs sont les plus fortes par rapport au témoin. Pour 'MD2', un seul traitement se démarque de tous les autres, il s'agit de S. D'après tous ces résultats, un traitement se démarque de tous les autres sur la stimulation de la croissance du plant : le stilfenia® seul ou en combinaison avec *Pontoscolex corethrurus* et *Trichoerma harzanium* dont l'application sur le plant a conduit à des modifications morphologiques mais aussi physiologiques puisque pour les deux espèces végétales étudiées la teneur en chlorophylle augmente considérablement. De même pour la masse des parties racinaires et la masse des parties aériennes. Cependant, ces données ne sont pas assez pertinentes pour affirmer avec certitude que le stilfenia® aurait un effet stimulateur de la croissance des plants. En effet, la plante est utilisée en agriculture biologique comme engrais vert, les plants traités avec cette substance ont donc pu recevoir une quantité supplémentaire d'azote. Pour soulever ce doute, il aurait fallu doser l'azote dans la plante afin de mettre en évidence des différences dans les apports d'azote.

2. Mise en évidence d'un impact des traitements sur la population de nématodes parasites des racines :

a) Chez le bananier 'cv-902' :

La figure 9 regroupe plusieurs graphes illustrant le nombre moyen d'individus juvéniles, mâles et femelles ainsi qu'un total des trois, recensés dans les pots en serre pour chacun des traitements.

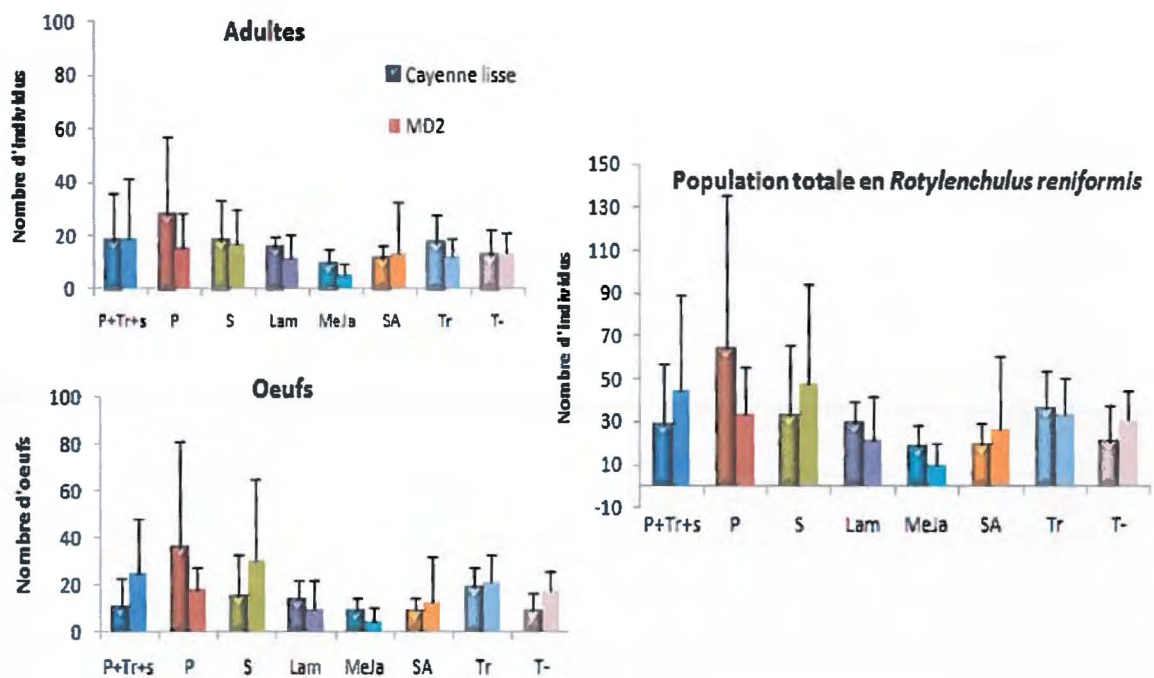


Figure 10 : Etat de la population de *Pratylenchus coffeae* sur bananier 902 en serre, après élicitation et inoculation de nématodes

L'étude statistique a révélé qu'il y a un effet traitement significatif sur la population des nématodes uniquement pour la distribution des femelles, qu'il n'y avait aucun effet traitement sur le nombre de mâles et de juvéniles.

Par rapport au témoin, on note une nette diminution de la population des mâles pour le traitement S. Les traitements P+Tr+S, P, MeJa et Tr, qui sont au même niveau, présente une légère baisse de nombre de mâles par rapport au témoin. Chez les femelles, les plants traités au S, au Lam et au MeJa voient leur nombre diminuer. D'une manière générale tous les traitements voient leur nombre de femelles qui a baissé. Pour P+Tr+S, le nombre de femelles est environ deux fois supérieur au témoin.

a) Chez l'ananas :

Les graphes de la figure 10, présentent l'état de la population de nématodes chez les plants d'ananas après traitement et inoculation du ravageur. A l'inverse des bananiers, il y a un effet traitement sur le nombre de mâles et sur le nombre d'œufs. Chez les deux cultivars, un seul traitement montre une différence notoire avec le témoin, que ce soit au niveau du nombre d'individus mâles ou le nombre d'œufs, il s'agit du traitement MeJa.

La partie expérimentale « nématologie » de l'étude montre des résultats non encourageants. En effet, un des objectifs de cette étude est de mettre en évidence un impact des traitements éliciteurs dans le contrôle des populations de nématodes en déclenchant chez la plante des mécanismes de défense de l'ISR. Soit il y a eut une ISR, et l'ISR est inefficace dans la lutte contre les nématodes ; soit il n'y a pas eut d'ISR, ce qui est peu probable. De plus, il est important de noter, que les données sont « brutes », elles proviennent de l'exploitation directe des valeurs obtenues par comptage. La dynamique des populations n'a pas été prise en compte. Un autre point important qui concerne les plants d'ananas : la terre lors de la récolte était trop humide pour permettre un développement normal des nématodes, qui eux craignent les milieux humides. Il aurait fallu diminuer encore plus l'apport d'eau par aspersion.

On note tout de même des diminutions du nombre d'individus importante sur bananier au niveau des plants traités au stilfénia®. De même pour les plants traités au méthyl jasmonate pour les deux variétés d'ananas. La corrélation de cette diminution de la population de

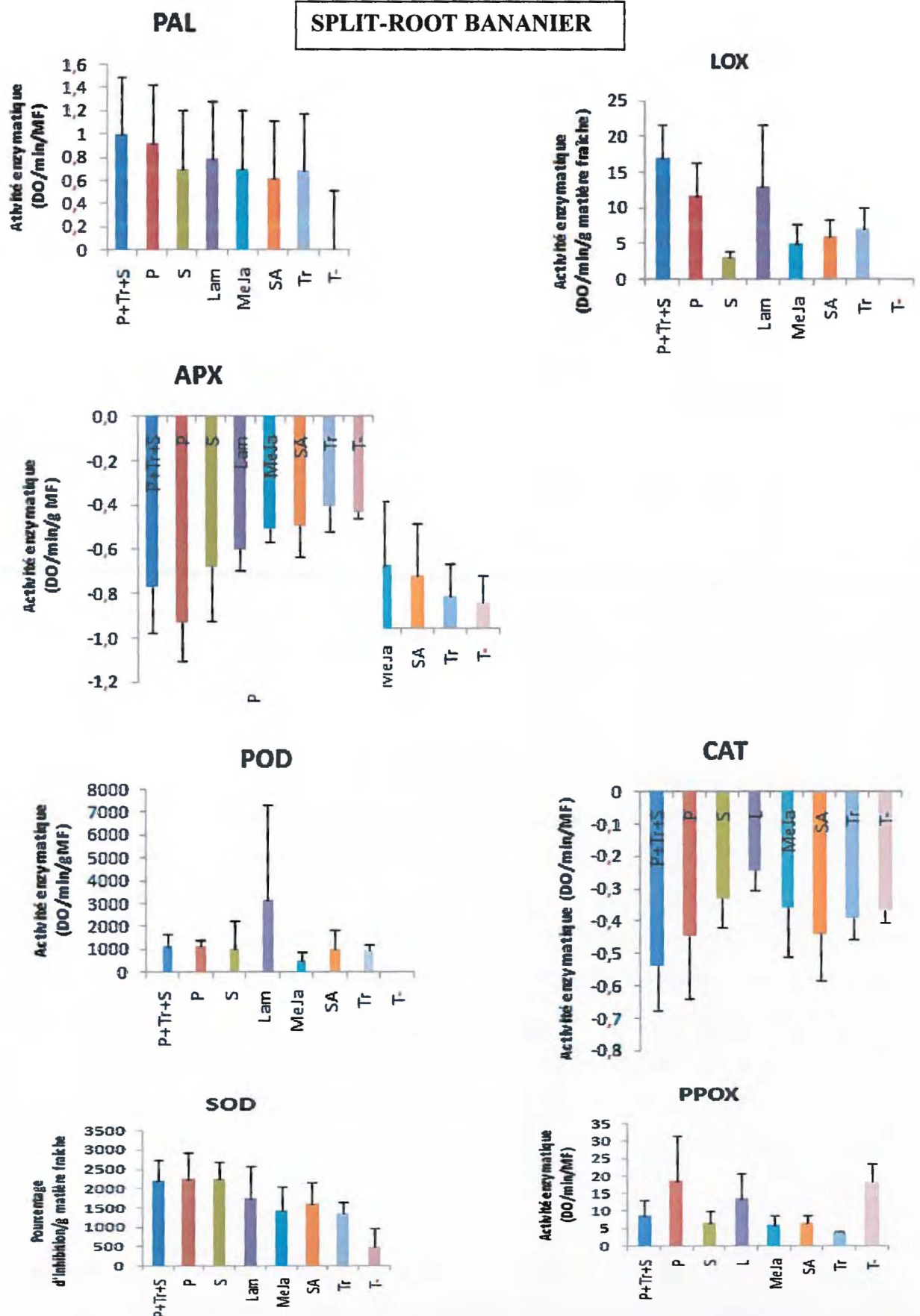


Figure 11 : graphes des activités enzymatiques des différentes enzymes dosées en fonction des traitements éliciteurs appliqués sur la partie traitée des split-root de bananier

nématodes à l'éliciteur se traduirait par des modifications de la biochimie de la plante. L'étude des activités enzymatiques ci-après permettront de répondre à cette hypothèse.

3. Mise en évidence d'une ISR par l'étude de l'impact des éliciteurs sur l'activité enzymatique d'enzymes impliquées dans les mécanismes de défense de la plante

a) Split-root bananier 'cv-902' :

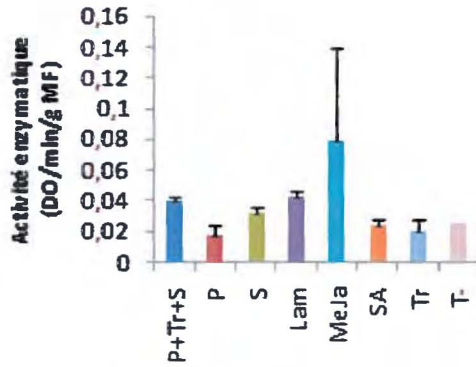
Pour des raisons indépendantes de nos volontés, cette expérimentation ne comporte pas de témoin. Les valeurs de témoins utilisées, pour l'exploitation des résultats, proviennent des plants de bananier 'cv-902' non inoculés de la serre. Les conditions de culture n'étant pas identiques d'autres plants témoins seront réalisées et mis dans les mêmes conditions que le split-root afin de compléter l'étude.

La figure 10 regroupe tous les graphes des activités enzymatiques des huit enzymes données en Activité/minute/g de Matière Fraîche (Activité/min/g de MF). Pour chaque graphe, on a les variations d'activités enzymatiques en fonction des traitements. L'étude statistique opérée sur les valeurs des dosages effectués sur les plants de split-root de bananier rend compte d'un effet traitement significatif pour toutes les enzymes sauf pour la PAL et la GST.

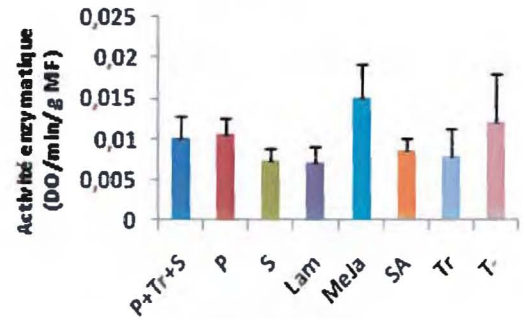
La PAL présente des activités enzymatiques élevées par rapport au témoin pour chaque traitement. Les deux traitements pour lesquelles la PAL est nettement supérieure sont les traitements P+TR+S et P. La LOX suit la même tendance avec en plus, un effet de la Lam. Le témoin a une activité trop faible pour apparaître sur le graphique à cette échelle. APX voit son activité augmenter avec la présence des éliciteurs. Les trois éliciteurs les plus marquants sont la combinaison P+Tr+S, P et Lam. P+Tr+S est aussi un stimulateur de l'activité de la GST, de même pour MeJa et SA. L'activité de la POD augmente dans tous les traitements, particulier avec la Lam. Pour la CAT les traitements P+Tr+S, P et SA ont un effet positif sur son activité. La Lam quant à elle tend à la faire diminuer. L'activité de la SOD, elle, augmente dans tous les traitements, surtout pour P+Tr+s, P et S. En ce qui concerne la PPOX, seul l'éliciteur P montre un effet positif sur l'activité de cette dernière enzyme.

BANANIER (pot simple)

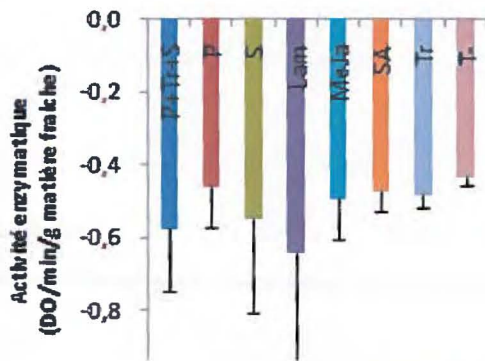
LOX



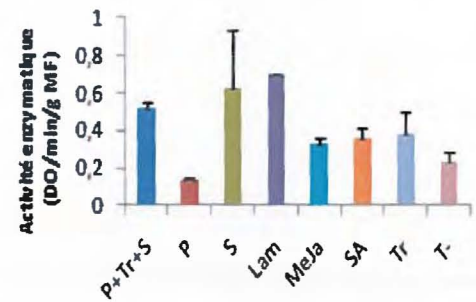
PAL



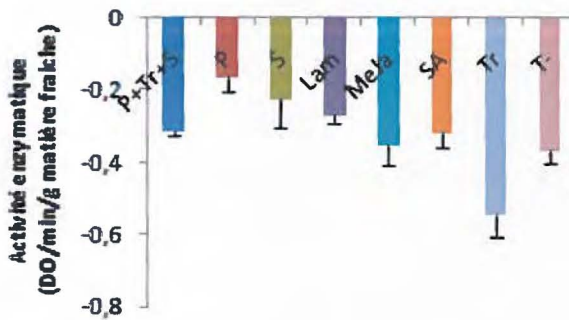
APX



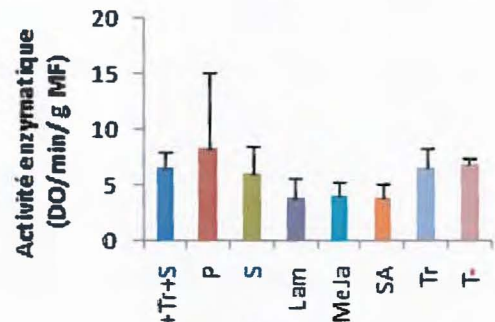
GST



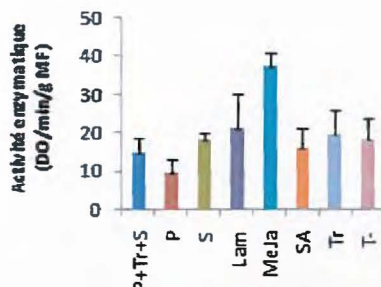
CAT



POD



PPOX



SOD

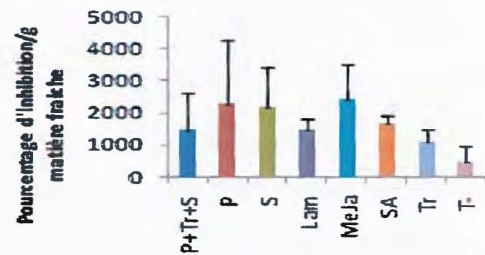


Figure 12: graphes des activités enzymatiques des différentes enzymes dosées en fonction des traitements éliciteurs appliqués sur les plants de bananiers (pot simple)

Le regroupement de certaines enzymes ensemble permet de mieux décrire les phénomènes de stimulation ou d'inhibition des activités enzymatiques. Un premier groupe composé de la PAL et la LOX : ce sont des enzymes impliquées dans le métabolisme des molécules signal (JA et SA), elles sont en amont du déclenchement des réactions de défense de la plante. Les enzymes des ROS : APX, POD, SOD, et CAT, qui forment le second groupe. Elles sont chargées de synthétiser ou d'anaboliser les ROS pour la protection des cellules du « burst oxydatif¹ ». Enfin, la GST et la PPOX, sont deux enzymes particulières qui sont des biomarqueurs de stress biotiques et/ou abiotiques. Elles sont traitées séparément car elles présentent des variations d'activités opposées pour tous les traitements.

Dans le premier groupe (PAL et LOX) les éliciteurs P et la combinaison P+Tr+S stimulent positivement sur la synthèse de ces enzymes. Il en est de même dans le second groupe (APX, POD, SOD et CAT). Pour la

GST, sa synthèse est stimulée en présence de MeJa, de SA et de la combinaison P+Tr+S. A contrario, ces éliciteurs inhibent la production de PPOX.

b) Plants de bananiers 'cv-902' en serre :

Dans la figure 11, sont regroupés tous les huit graphes des huit enzymes donnant l'activité enzymatique pour chaque traitement éliciteur. L'étude statistique des données expérimentales montre qu'il y a un effet des traitements sur l'activité enzymatique significatif pour toutes les enzymes sauf la SOD, l'APX, la PPOX et la CAT. Dans la majorité des cas (3/8), il y a un effet répétition significatif.

On observe dans le premier groupe (LOX et PAL) un effet positif significatif de MeJa sur la synthèse des enzymes de ce groupe. Pour le second groupe, les enzymes présentent des comportements différents selon les traitements. Pour l'APX et la SOD, l'activité augmente dans tous les cas de figures, ce qui n'est pas le cas de la POD et de la CAT. Pour ce dernier traitement, l'éliciteur Tr a stimulé son activité. La PPOX a une activité accrue dans les plants traités au MeJa. Pour la GST, c'est plutôt la Lam et le S.

c) 'Cayenne lisse' et 'MD2' en serre :

¹ Stress oxydatif généré par la plante par la production de ROS, molécules toxiques impliquées dans les mécanismes de défense.

'CAYENNE LISSE' (plants en serre)

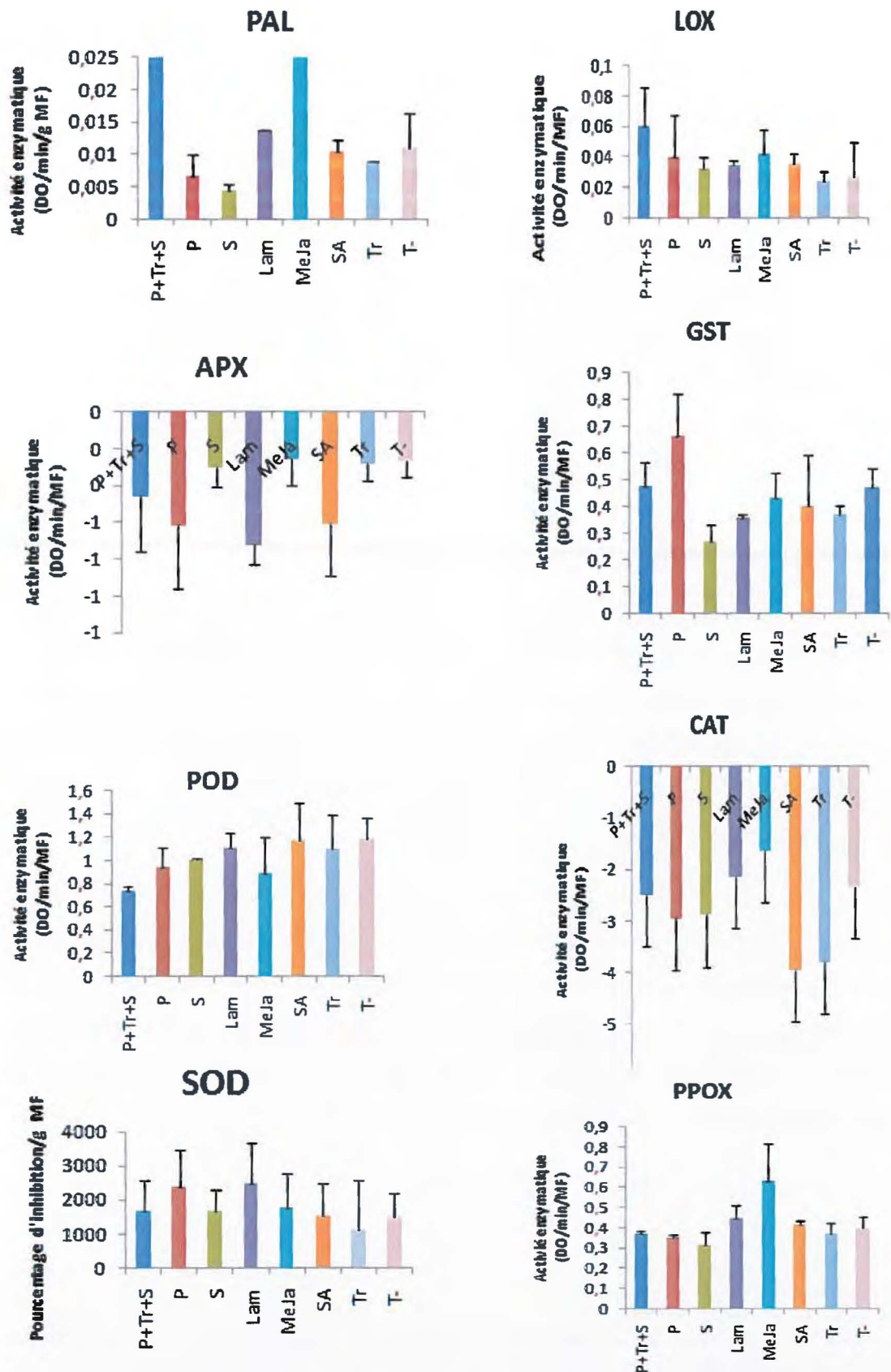


Figure 13: graphes des activités enzymatiques des différentes enzymes dosées en fonction des traitements éliciteurs appliqués sur les plants de la variété Cayenne lisse

Les figures 13 rassemblent les graphes donnant l'activité enzymatique des différentes enzymes pour chaque traitement opérés sur les plants d'ananas de la variété 'Cayenne lisse'. La figure 14, concerne la variété 'MD2'. L'étude statistique opérée sur les valeurs d'activités enzymatiques de ces deux variétés indique qu'il n'y a pas d'effet significatif des traitements éliciteurs sur l'activité enzymatique de la majorité des enzymes étudiées (2/8). Cinq enzymes sur huit montrent un effet répétition significatif et l'effet de la variété sur l'activité enzymatique n'est significatif que pour la GST.

Pour une même variété les traitements ont des effets différents sur l'activité enzymatique et aucun traitement n'a le même effet sur les enzymes.

'Cayenne lisse' présente des augmentations de l'activité enzymatique de la PAL, la LOX et la PPOX en réponse à l'éliciteur MeJa. La PAL et la GST ont leur activité enzymatique qui augmente avec la combinaison des traitements P+Tr+S. L'application de la Lam stimule positivement la synthèse d'APX et de la SOD. La POD présente des activités enzymatiques non significativement différentes du témoin pour tous les traitements. La CAT voit son activité fortement augmenter avec les éliciteurs SA et Tr. Pour toutes les enzymes, il s'avère que le traitement S induit un effet négatif ou aucun effet sur l'activité enzymatique des enzymes. Il en est de même pour l'éliciteur Tr qui induit soit une diminution, soit aucun effet de l'activité enzymatique des enzymes, mis à part pour la CAT où il stimule positivement son activité.

En ce qui concerne 'MD2', on retrouve à peu près les mêmes variations, mise à part quelques variations. La LOX et la PAL ont aussi une augmentation de l'activité enzymatique avec l'éliciteur MeJa. L'éliciteur S a un effet négatif, ou aucun effet sur l'activité enzymatique de toutes les enzymes. Il faut noter que pour la PAL, les traitements P+Tr+S et MeJa induisent une très augmentation de l'activité par rapport aux autres traitements. Les traitements P, Tr et S seul n'ont pas le même effet que lorsqu'ils sont combinés. Y aurait-il un intérêt à cumuler plusieurs éliciteurs ? Il faudrait, dans la poursuite de l'étude tester d'autres combinaisons de plusieurs éliciteurs.

Globalement, les traitements ont des effets différents selon l'enzyme, et cela pour les deux variétés. Aucun traitement n'a d'effet probant sur la modulation de l'activité enzymatique des enzymes.

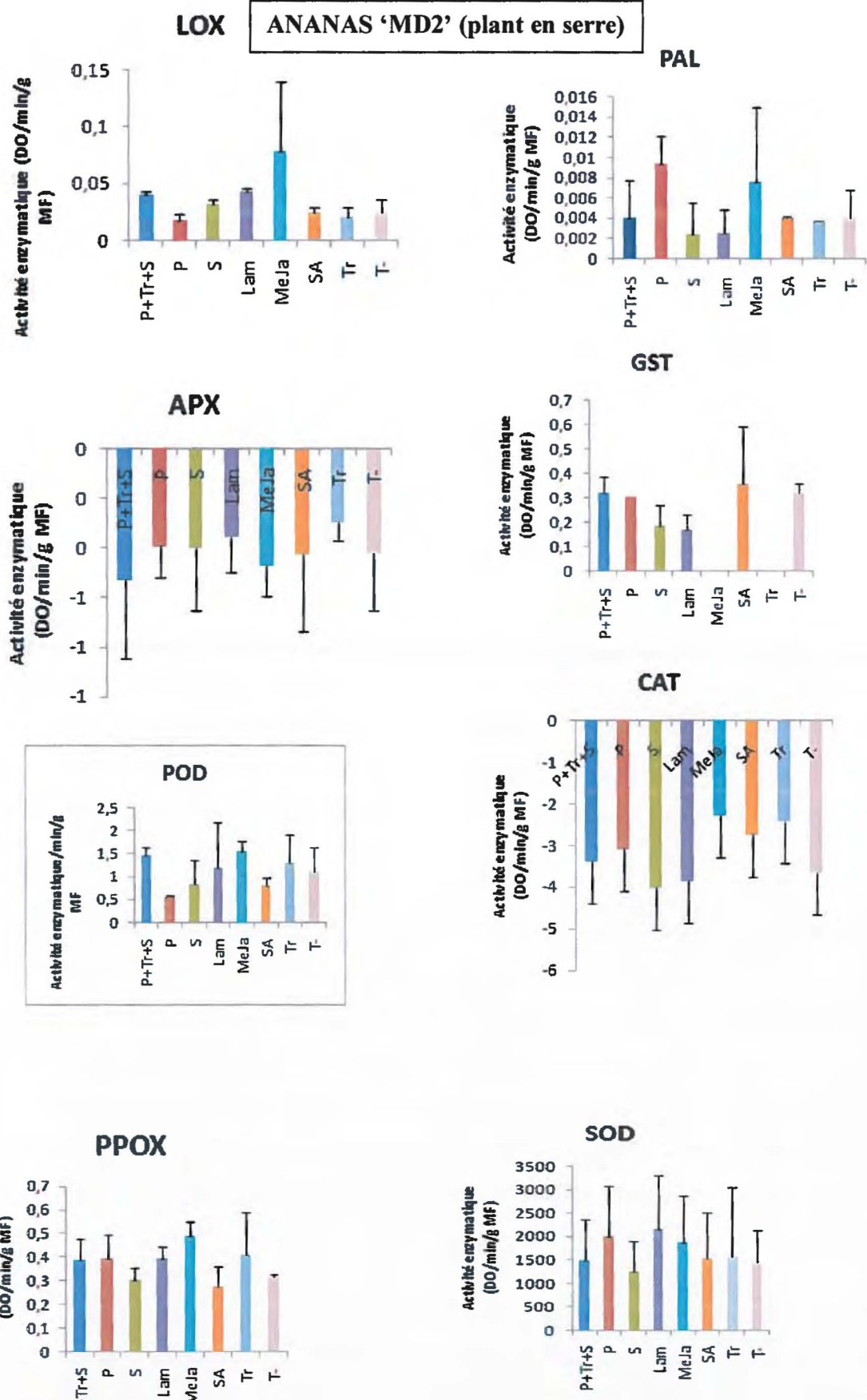


Figure 14: graphes des activités enzymatiques des différentes enzymes dosées en fonction des traitements éliciteurs appliqués sur les plants de la variété MD2 (pot simple)

Les résultats d'activité enzymatique obtenus à partir des plants d'ananas traités et non inoculés de la serre sont difficilement exploitables. Aucun effet traitement n'est réellement mis en avant. Pour un traitement, les variations observées pour toutes les enzymes n'est pas constant, on a soit aucun effet, une stimulation ou une inhibition de l'activité enzymatique. Cependant, il s'agit d'enzymes dont les mécanismes de contrôle de la synthèse sont extrêmement complexes. Les variations pourraient s'expliquer par le maintien d'un équilibre entre les enzymes. Si l'on se rapporte au résultat de la partie « nématologie », seul le traitement MeJa montrait des résultats satisfaisants. Ce traitement éliciteur induit une augmentation de l'activité enzymatique de la PAL, la LOX, la PPOX et la SOD des deux variétés d'ananas. La POD et la CAT voient leur activité enzymatique diminuer en présence de MeJa. Cet éliciteur stimulerait donc la synthèse de molécules signal (PAL et LOX), et induirait des mécanismes de défense en activant des enzymes de ROS, entre autres. S'agirait-il d'une résistance systémique induite ? Si les résultats de nématologie avaient permis de mettre en évidence un impact conséquent de l'élicitation sur le développement des nématodes, il nous aurait été facile de conclure qu'il s'agisse bien d'une ISR, ce qui n'est pas le cas. S'il y eut une ISR, alors celle-ci n'est pas efficace dans la lutte biologique contre les nématodes, ou les éliciteurs testés ne sont pas apte à induire dans la plante une action déterminante dans le contrôle des nématodes.

Malgré le rôle connu de chaque enzyme dans les mécanismes de défenses mises en place par la plante lors d'une ISR, sur toutes les enzymes étudiées, aucune n'a montré de résultats d'activité enzymatique assez probant pour la qualifier d'enzyme biomarqueur de l'ISR. Le dosage des glucanases et des chitinases, deux enzymes impliquées dans les attaques d'agents pathogènes, sera effectué afin de mettre en évidence l'influence des traitements sur ces deux enzymes. Les résultats sur ces enzymes pourraient s'annoncer plus déterminantes dans la mise en évidence d'une ISR ;

Comme le montre l'étude, les effets des éliciteurs sur les enzymes sont multiples et variés mais leur étude comporte un intérêt important pour l'agriculture. Il s'agit d'une piste de recherche à développer afin de développer de nouvelles techniques de lutte plus respectueuse de l'environnement.

Conclusion :

Le CIRAD est un organisme mondialement connu, notamment au travers de ces recherches. L'expérimentation effectuée au sein de l'UR26 a été un stage formateur et complet. Il m'a permis d'avoir une approche plus globale de la recherche agronomique. De la mise en place de l'essai, sur le terrain et en chambre de culture, en passant par la réalisation des traitements, la recherche bibliographique, les manipulations de dosages enzymatiques au laboratoire de biochimie, sans compter toute la partie nématologie, ce stage a été vraiment très enrichissant.

Le stage comporte quatre étapes :

- 1) Mise en place du dispositif expérimental et suivi du développement des plants
- 2) Récolte des échantillons pour les dosages enzymatiques et pour la partie nématologie
- 3) Obtention des résultats par la détermination des populations de nématodes dans les plants inoculés et dosage enzymatique des échantillons prélevés
- 4) Exploitation de tous les résultats

Les résultats sur la croissance ont montré un effet positive de la croissance en présence de l'éléciteur stilfénia®, les différences morphologiques entre les plants (bananier et ananas) traités avec cet éléciteur et les autres traitements étaient flagrantes. Chez le bananier, les feuilles étaient plus grandes, la couleur plus verte, plant était nettement plus rigoureux. De même pour les ananas, où les plants traités au stilfénia® avaient une croissance importante. Cependant, cela n'affirme en rien que le stilfénia® stimulerait la croissance du végétal, la solution de stilfénia® aurait bien pu agir comme un engrais vert, propriété exploitée en agriculture biologique. Ces données sont quand même encourageante pour toutes les pépinières, où ce produit pourrait être utilisé afin d'optimiser la phase de grossissement et d'acclimatation des vitro-plants en serre.

En ce qui concerne la partie nématologie, les traitements éléciteurs n'ont pas montré d'efficacité dans le contrôle des nématodes. Pour les ananas en serre, il est vrai que l'excès d'humidité n'aurait pas permis l'installation la population de nématodes inoculés. Il serait intéressant de répéter l'étude en chambre de culture sur des plants plus jeunes et d'augmenter la durée de période d'élécitation. En effet, le rallongement de la période de traitement pourrait optimiser le priming de la plante.

L'essai split-root (bananier et ananas) n'a pas permis de mettre en évidence une résistance systémique induite de la plante, ou du moins aucune enzyme n'a donné de résultats probants permettant de démontrer une résistance systémique induite. Il serait intéressant de compléter à cette étude une partie « essai au champ » avec une élicitation et une inoculation d'un pathogène avec une estimation de l'ampleur des dégâts ou de la résistance par observation macroscopique des dégâts éventuels. Sur les deux expérimentations (split-root et pots simples inoculés), avec les deux variétés d'ananas et la variété banane, seule la partie split-root ananas n'a pas encore été traitée. Après la récolte des échantillons qui aura lieu le vendredi 27 août, les analyses enzymatiques seront réalisées afin d'optimiser les temps restant dans la structure d'accueil.

L'étude réalisée au cours de mon stage est une ébauche d'une grande étude dont la finalité sera de pouvoir proposer des alternatives aux produits chimiques en exploitant au maximum les capacités de la plante à se défendre. La résistance systémique induite fait partie de ces capacités. Dans un premier temps, il a été question de tester des éliciteurs chimiques mais aussi des substances provenant d'organismes vivants. L'étape suivante sera de tester l'impact de micro-organismes dans les mécanismes de défense de la plante par l'induction d'une résistance systémique induite.

Cette perspective de pouvoir gérer durablement une culture en stimulant les défenses naturelles de la plante est extrêmement intéressante puisqu'elle s'insère dans la volonté des exigences actuelles de santé publique et environnementale, qui préoccupent tant les consommateurs.

Toute l'expérience acquise au sein de stage permet de compléter mon expérience professionnelle que j'ai obtenue lors de mon stage précédent en agriculture biologique. Elle m'a permis de gérer une étude expérimentale, de la mise en place du dispositif expérimental à l'obtention des résultats en passant par le suivi et la planification du calendrier expérimental.

Quatre points forts ressortent de ce stage :

- 1) La connaissance de systèmes de culture tropicale. Le fait d'avoir à gérer des plants de bananier et d'ananas m'a permis d'acquérir les connaissances sur les exigences culturales de ces espèces : fertilisation, contrôle des pathogènes, entre autres. Originnaire de la Nouvelle-Calédonie, où la production de bananier et d'ananas à l'échelle intensive est inexistante, ce stage m'a permis de voir une autre facette de l'agriculture tropicale.

- 1) L'identification des nématodes *Pratylenchus coffeae* et *Rotylenchulus reniformis*, fut très enrichissante. L'aide précieuse de Mr Patrick Quénéhervé, grand spécialiste des nématodes, m'a permis d'acquérir quelques notions dans l'identification spécifiques des nématodes mais aussi les protocoles d'extraction de ces ravageurs sur racines de bananier et d'ananas.
- 2) La recherche bibliographique sur les mécanismes de défense induite par la plante notamment la résistance systémique acquise et la résistance systémique induite. Il s'est avéré que la bibliographie sur la résistance systémique induite est restreinte comparée à la résistance systémique acquise. L'étude a nécessité un approfondissement des connaissances sur la résistance systémique induite et les éliciteurs, ainsi que les modes de fonctionnement des enzymes et les réactions de défense qu'elles enclenchent. Ces acquis biochimique viennent compléter mes acquis en phytopathologie.
- 3) Toute la partie dosage enzymatique passée en laboratoire a été novateur pour moi dans le sens où je n'ai jamais eut la chance de travailler dans un laboratoire aussi équipée que celui du CIRAD.

Ce stage m'a aussi permis d'avoir connaissance des autres sujets d'étude dont se préoccupe le CIRAD dont la recherche variétale, sur bananier et ananas, pour la création de nouvelles variétés résistance et répondant aux critères gustatifs des consommateurs. Notons aussi, les études de recherche portées sur la chlordécone, pesticide persistant à l'origine de plusieurs cancers aux Antilles françaises. Cette polémique, s'ajoute à la longue liste des arguments optant pour une protection des cultures plus respectueuse de l'environnement, d'où la nécessité d'étudier toutes les pistes possibles notamment l'utilisation d'éliciteurs comme alternative à la lutte chimique.

Bibliographie :

Adam A. Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des Rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de Doctorat, Université de Liège, Belgique, p 165. (2008)

Akram A., Ongena M., Duby F., Dommes F., Thonart P. Systemic resistance and lipoxigénase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC Plant Biology*, 8:13 (2008)

Avallone, S., Guiraud, J-P., Brillouet J-M., Teisson C., Enzymatic browning and biochemical alterations in black spots of pineapple, (2003) *Current Microbiology* **47**, 113-118.

Bolwell G.P. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2:287-294. (1999)

Damodaran, T., Kumar, N., Kavino, M., Breeding and evaluation of Musa hybrids resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubence race 1, (2009) *Fruits* **64**, 3-12.

Gandia-Herreo F., Jeménez-Atiénzar M., Cabanes J., Garcia-Carmona F., Escrito J. Differential activation of a latent polyphenol oxidase mediated by sodium dodecyl sulfate. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (17), (2005)

Hammerschmidt, R., Nuckles, E.M., Kuc, J., Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*, (1982) *Physiology Plant Pathology* **20**, 73-82.

Kapoor R. Induced resistance in mycorrhizal tomato is correlated to concentration of jasmonic acid. *OnLine Journal of Biological Sciences* 8 (3) : 49-56, (2008)

Khan, J., Ooka, J. J., Miller, S. A., Madden, L. V., Hoitink, H. A. J. Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against *Phytophthora* crown rot and leaf blight. *Plant Disease*, **88**: 280-286., (2004)

Martinez C. et Clergue T. Lutte contre l'oïdium de la vigne : un nouveau stimulateur des défenses naturelles. *Phytoma, la défense des végétaux* n°591, pp 40-41, (2006)

Lafont A., Risède J-M., Loranger-Merciris G., Clermont-Dauphin C., Dorel M., Rhino B., Lavelle P. Effects of the earthworm *Pontoscolex corethrurus* on banana plants infected or not with the plant-parasitic nematode *Radophulus similis*. *Pedobiologia* 51 (2007)

Mayer A.M., Haul E., Shaul R.B., Assay of catechol oxidase, a critical comparison of method, (1965) *Phytochemistry* **5**, 783-789.

Miller G., Shulaev V., Mitter R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress, *Physiologia Plantarum*, vol 133, p 481-489 (2008)

Neves, V.A., & Da Silva M.A., Polyphenol Oxidase from Yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*), 2007 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 2424-2430.

Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J-L., Thonart P. Surfacting and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology*, vol. 9 (2007)

Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T., Prakasam V., Samiyappan R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and diseases. *Crop Protection* (2001) **20** 1, 11.

Thaler J. S. Jasmonic acid mediated interactions between plants, herbivores, parasitoids, and pathogens: A review of field experiments in tomato. Pages 319-334 in A. Agrawal, S. Tuzun, and E. Bent, eds. *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture*, p 319-334 (1999)

Thaler J.S., Owen B., Higgins V.J. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Ecology* **85**: 48-58 (2004)

Wuyts, N., De Waele, D., Swennen, R., Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots, (2006) *Plant physiology and Biochemistry* **44**, 308-314.

Yalpani N., Shulaev V., Raskin I. Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus-resistance in tobacco. *The plant cell*, vol 3 (1994)

Zhang S., Moyne A-L., Reddy M.S., Kloepper J.W. The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control* **25** 288-296.(2002)

ANNEXES :

ANNEXE I : protocole d'extraction enzymatique


ANNEXE II : protocole des dosages enzymatiques

ANNEXE III : protocole d'extraction des nématodes de racines de bananier

ANNEXE IV : protocole d'extraction des nématodes de racines d'ananas

ANNEXE IV : étude statistique des résultats

ANNEXE I

	LABORATOIRE BIOCHIMIE	MODE OPERATOIRE	Date d'application : Code : MO - Révision : 00
	DOCUMENT QSE	EXTRACTION ENZYMATIQUE SUR LES RACINES	

EXTRACTION ENZYMATIQUE SUR LES RACINES D'ANANAS ET DE BANANIERES

Désignation :	Rédaction	Vérification	Approbation
Nom :	M. François-Haugrin	A. Soler	
Fonction :	VCAT	Chef d'équipe	Conseil de groupement du PRAM
Date :	26/02/10		
Signature			

Modification à l'origine de cette version :

Version initiale

Document : ☒ géré ☐ non géré

I. Objet et domaine d'application

Ce document décrit le protocole d'extraction des enzymes sur les racines d'ananas et de bananiers.

Ce mode opératoire s'adresse à toutes les personnes susceptibles de travailler sur ce type d'analyse (les techniciens, les VCATs, les thésards et les stagiaires).

II. Principe de la méthode

Les racines sont découpées en petits morceaux puis broyées dans une solution tampon afin d'obtenir un extrait enzymatique, qui sera analysé ensuite par spectrophotométrie.

III. Documents associés

Textes de référence :

- Dawson, « Data for biochemical research », third edition, Oxford
- Wuyts *et al.*, 2006, Neves *et al.*, 2007, Damodaran *et al.*, 2009

Documents internes :

MO Dosage de l'activité enzymatique par spectrophotométrie.

IV. Abréviations

PVP : Polyvinylpolypyrrolidone

V. Moyens employés

a. Le matériel

Le matériel critique est identifié par un « * ».

Liste des appareils utilisés :

Bras mixeur blanc Carrefour* (salle 201 dans le laboratoire de Biochimie paillasse mobile)

Centrifugeuse Jouan MR 23i* (salle 201 dans le laboratoire de Biochimie)

Agitateur magnétique

Deux balances dont une de précision

Pompe à vide

Liste du petit matériel nécessaire :

Couteau affûté*

Sabots de pesées, Spatules

Béchers de 250 mL, éprouvettes

Barreaux aimantés

Pipette de 200 µl + pointes

Matériel de filtration sous vide : support élévateur, erlen Meyer, fritté + pince, papier filtre Whatman grade n°1, Ø 47 mm

Pots à usage unique (avec bouchon rouge) + Aluminium

b. Les réactifs

Les réactifs critiques sont identifiés par un «*».

Liste des produits consommables utilisés :

Tween 20*

Tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 0,1 M, pH 6,8-8

Polyvinylpolypyrrolidone (PVP)

c. Consignes de sécurité spécifiques

Le couteau doit être utilisé avec prudence afin d'éviter toute coupure.

Rappel d'ordre général important : se référer à l'instruction I-L-01 « consignes de travail, d'hygiène et de sécurité dans les laboratoires ».

d. Etalon et Calibrage

Néant.

e. Processus Opératoire

Le protocole d'extraction enzymatique à partir de racines de bananier et d'ananas a été élaboré après recherche bibliographique (Wuyts *et al.*, 2006, Neves *et al.*, 2007, Damodaran *et al.*, 2009).

Après récolte, les racines sont soigneusement rincées puis congelées à -20°C dans des sachets en plastique et clairement identifiées par lots.

Récupérer un lot de racines congelées et prélever un échantillon de 2,5g. Remettre au congélateur le reste des racines non utilisées.

Sur une planche à découper, couper chaque échantillon de racines en petits morceaux à l'aide d'un couteau affûté. Ces derniers sont ensuite broyés à l'aide d'un mixeur (modèle bras, Carrefour) dans une solution d'extraction contenant 20mL de solution de tampon phosphate, 5% de PVP et 0.25% de Tween 20. L'extraction se fait à 4°C, dans un bécher placé dans un bac à glace, afin de préserver l'activité des enzymes.

Le broyat est ensuite centrifugé à 4°C pendant 30 minutes à 14000 rpm. Le surnageant est récupéré pour être filtré sous vide. Mettre chaque filtrat dans un pot à usage unique, clairement identifié (nom de l'échantillon, numéro de lots, date) et envelopper la partie transparente avec un bout d'aluminium pour éviter que les extraits ne s'oxydent à la lumière. Conserver les extraits enzymatiques à 4°C.

Les échantillons sont prêts pour l'analyse des activités enzymatiques.

Remarques :

- 1) Le PVP fixe les phénols empêchant ainsi leur oxydation en quinones toxiques.
- 2) Le pH de la solution de tampon phosphate utilisée dépend de **l'enzyme à extraire**. Chaque enzyme est extrait à son **pH optimum** afin d'avoir des enzymes actives.

La solution tampon adéquate pour l'extraction est à préparer à partir de deux solutions initiales, mises dans des proportions fonctions du pH : une solution **A de Na_2HPO_4** à 0,2 M et une solution **B de NaH_2PO_4** à 0,2 M.

Tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), à un pH donné :

x ml de solution **A** + y ml de solution **B** dilués à 100ml d'eau distillée

x et y (ml) dépendent du pH de l'enzyme à extraire et $x + y = 50 \text{ mL}$.

Pour connaître les quantités de x et de y à mettre, se référer au DAWSON (Data for biochemical Research), page 432.

f. Expression des résultats

1. Les critères de validation

Néant

2. Les calculs

Néant

3. La limite de détection

Néant

4. L'incertitude des résultats

Néant

5. Les auto-contrôles

Les balances sont contrôlées 1 fois par ans par « BALCO » qui fourni un certificat et qui est archivé par le responsable sécurité.

Avant d'utiliser la centrifugeuse, bien équilibrer les extraits à centrifuger et renseigner le cahier prévu à cet effet pour avoir une traçabilité (date, utilisateur, pesées balance et pesées de l'équilibrage).

Le pH-mètre doit être étalonné 1 fois par mois dans les conditions d'utilisation normales (soit une fois par jour).


g. Conditions de conservation et d'élimination des échantillons

Les échantillons sont conservés à 4°C de l'extraction jusqu'à l'analyse spectrophotométrique. Une fois les analyses finies, ils sont congelés à -20°C.

h. Commentaire – Remarque

Cf. ci-dessus.

ANNEXE II

	LABORATOIRE DE BIOCHIMIE	MODE OPERATOIRE	Date d'application : <i>Code : MO -</i> <i>Révision : 00</i>
	DOCUMENT QSE	Dosage des activités enzymatiques par spectrophotométrie	

DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES PAR SPECTROPHOTOMETRIE

Désignation :	Rédaction	Vérification	Approbation
Nom :	M. François-Haugrin	A. Soler	
Fonction :	VCAT	Chef d'équipe	Conseil de groupement du PRAM
Date :	28/02/10		
Signature			

Modification à l'origine de cette version :

Version initiale

Document : ☒ géré ☐ non géré

I. Objet et domaine d'application

Ce document décrit le principe de dosage de l'activité des enzymes extraites sur les racines d'ananas et de bananiers.

Ce mode opératoire s'adresse à toutes les personnes susceptibles de travailler sur ce type d'analyse (les techniciens, les VCATs, les thésards et les stagiaires).

II. Principe de la méthode

Après avoir extrait les enzymes des racines, le dosage des activités enzymatiques se fait par spectrophotométrie UV/Visible dans des cuves PMMA ou en Quartz et à une longueur d'onde précise.

III. Documents associés

Indiquer toutes les références : textes de référence (normes, documents externes) et documents internes (MQ, procédures, modes opératoires, autres instructions,) auxquelles fait appel le mode opératoire.

IV. Abréviations

PPOX : Polyphénoloxylase

APX : Ascorbate Peroxydase

POD : Peroxydase

PAL : Phenylalanine Ammonia-lyase

LOX : Lipoxygénase

CAT : Catalase

GST : Glutathion-S-Transférase

SOD : Superoxyde Dismutase

V. Moyens employés

b. Le matériel (en spécifiant le matériel critique)

Le matériel critique est identifié par un «*».

Liste des appareils utilisés :

Spectrophotomètre UV/Visible double faisceau, Cary 100 Scan, Varian (salle 201 dans le laboratoire de Biochimie paillasse mobile)

Centrifugeuse Jouan MR 23i * (salle 201 dans le laboratoire de Biochimie)

Agitateur magnétique

Balance de précision

Liste du petit matériel nécessaire :

Sabots de pesées, spatules

Barreaux aimantés

Béchers, fioles jaugées

Pipettes (200 µl, 1000 µl, 5000 µl et 10000 µl) + pointes

Cuves PMMA, micro-cuves (Plastibrand), cuves en Quartz

Parafilm

b. *Les réactifs*

Les réactifs critiques sont identifiés par un « * ».

Liste des produits consommables utilisés :

Tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)

Pyrocathécol *

Tampon citrate (Acide citrique/ Na_2HPO_4)

Gaïacol *

Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) *

Acide ascorbique

Tween 20 *

Acide linoléique

ChloroDiNitroBenzène (CDNB) *

L-Glutathion réduite

Acide diéthylène-triamine pentaacétique (DETAPAC) *

Nitro Bleu de Tétrazolium (NBT) *

Xanthine et Xanthine Oxydase *

Tampon borate (Acide borique + solution de Borax (Sigma))

L-Phénylalanine

Sel de protamine sulfate de saumon *

c. *Consignes de sécurités spécifiques*

Ce paragraphe a lieu d'exister dans le cas de consignes spécifiques au mode opératoire rédigé. Pour tout rappel d'ordre général important faire référence à l'instruction I-L-01 « consignes de travail, d'hygiène et de sécurité dans les laboratoires ».

d. *Etalon et Calibrage*

Néant.

e. *Processus Opératoire*

Récupérer les extraits enzymatiques et les conserver à 4°C dans de la glace. Pour un extrait donné, on réalisera le dosage des activités enzymatiques 2 ou 3 fois.

- Dosage de l'activité des Polyphénoloxydases (PPOX)

Le protocole de mesure des PPOX a été mis au point à partir de la méthode de Mayer *et al.*, 1965 et Avallone *et al.*, 2003. Ces enzymes transforment les composés phénoliques en produits quinoniques. Dans notre cas, le substrat utilisé est le pyrocathécol et est oxydé en o-Quinone qui absorbe à 420 nm.

Préparations préalables :

Préparation du tampon :

Tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 0,1 M, pH 6,8 pour 100 ml : Cf. page 432 du DAWSON (Data for biochemical Research).

Préparation du substrat :

Pyrocathécol à 50 mM : Mettre 0,27 g de pyrocathécol dans 5 ml d'eau distillée et agiter.

Mélange réactionnel :

Cuve blanc : 2,7 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8

+ 300 µl de pyrocathécol à 50 mM

Cuve essai : 2,5 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8

+ 300 µl de pyrocathécol à 50 mM

+ 200 µl d'extrait pur

L'étude de la cinétique enzymatique se fait à une longueur d'onde 420 nm, pendant 4 minutes dans des cuves PPMA, à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible.

L'activité est donnée en $A_{420} \cdot \text{min}^{-1}$.

- Dosage de l'activité des Peroxydases (POD)

Le protocole de mesure des POD est inspiré de la méthode mise en place par Hammerschmidt *et al.*, 1982. Ces enzymes oxydent les phénols en présence de peroxyde d'hydrogène.

Préparations préalables :

Préparation du tampon :

Tampon citrate (acide citrique/ Na_2HPO_4) 0,2 M, pH 5 pour 100 ml : Peser 1,02 g d'acide citrique et 1,46 g de Na_2HPO_4 et les mettre dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée, agiter et ajuster le pH à 5.

Préparation des substrats :

Gaïacol à 69 mM : Mettre 980 μl de gaïacol dans 100 ml de tampon citrate et bien agiter. Couvrir la fiole de papier aluminium pour éviter l'oxydation du gaïacol.

Peroxyde d'hydrogène à 10 mM : Mettre 310 μl de H_2O_2 dans 50 ml d'eau distillée et agiter.

Mélange réactionnel :

Cuve blanc : 2,3 ml de tampon citrate 0,2 M, pH 5 contenant du gaïacol à 69 mM

+ 500 μl de H_2O_2 à 10 mM

+ 200 μl d'eau distillée

Cuve essai : 2,3 ml de tampon citrate 0,2 M, pH 5 contenant du gaïacol à 69 mM

+ 500 μl de H_2O_2 à 10 mM

+ 200 μl d'extrait dilué au 1/100^e

L'étude de la cinétique enzymatique est réalisée pendant 4 minutes à 470 nm dans des cuves PPMA, à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible. L'activité est donnée en $A_{470} \cdot \text{min}^{-1}$.

• Dosage de l'activité de l'Ascorbate Peroxydase (APX)

Le protocole de mesure de l'APX a été défini à partir de la méthode de Schoener *et al.*, 1990, modifiée par Zhou *et al.*, 2002. L'activité de cette enzyme est déterminée en mesurant la réduction de l'acide ascorbique en ascorbate, en présence de peroxyde d'hydrogène.

Préparations préalables :

Préparation du tampon :

Tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 50 mM, pH 7 pour 100 ml : Cf. page 432 du DAWSON (Data for biochemical Research).

Préparation des substrats :

Acide ascorbique à 0,5 mM : Dissoudre 0,0176 g d'acide ascorbique dans 100 ml d'eau distillée.

Peroxyde d'hydrogène à 0,5 mM : Mettre 50 μl de H_2O_2 dans 100 ml d'eau distillée et agiter.

Mélange réactionnel :

Cuve blanc : 2,45 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7

+ 145 µl d'acide ascorbique à 0,5 mM

+ 300 µl d'eau distillée

+ 200 µl d'extrait enzymatique

Cuve essai : 2,45 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7

+ 145 µl d'acide ascorbique à 0,5 mM

+ 300 µl de H₂O₂ à 0,5 mM

+ 200 µl d'extrait enzymatique

La cinétique enzymatique de l'APX est suivie à 290 nm pendant 4 minutes dans des cuves en Quartz, avec un spectrophotomètre UV. L'activité, donnée en A₂₉₀.min⁻¹, prendra des valeurs négatives.

- Dosage de l'activité de la Catalase (CAT)

De même que pour l'activité de l'APX, le protocole de mesure de l'activité de la CAT a été mis au point à partir de la méthode de Schoener et *al.*, 1990. La décomposition du peroxyde d'hydrogène par la catalase est suivie au spectrophotomètre UV à 240 nm.

Préparations préalables :

Préparation du tampon :

Tampon phosphate (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) 50 mM, pH 7 pour 100 ml : Cf. page 432 du DAWSON (Data for biochemical Research).

Préparation du substrat :

Peroxyde d'hydrogène à 0,34 M : Mettre 1,75 ml de H₂O₂ dans 50 ml d'eau distillée et agiter.

Mélange réactionnel :

Cuve blanc : 2,5 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7

+ 300 µl d'eau distillée

+ 200 µl d'extrait enzymatique

Cuve essai : 2,5 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7

+ 300 µl de H₂O₂ à 0,34 M

+ 200 µl d'extrait enzymatique

La cinétique de la catalase est mesurée à 240 nm pendant 4 ou 5 minutes dans des cuves en Quartz, avec un spectrophotomètre UV. Elle est donnée en $A_{240} \cdot \text{min}^{-1}$ et prendra des valeurs négatives.

- Dosage de l'activité de la Lipoxygénase (LOX)

Le protocole de mesure est inspiré de la méthode utilisée au PARM.

Préparations préalables :

Préparation du tampon substrat (A) :

Tampon NaH_2PO_4 anhydre à 0,1 M, pH 6,5 : Peser 6,0g de NaH_2PO_4 dans 500ml d'eau distillée et ajuster à pH 6,5.

Préparation du substrat :

Dans une fiole de 200 ml, introduire 0,5 ml de Tween 20. Ajouter 10 ml de tampon A et 0.564 g d'acide linoléique (2 mmol). Agiter vigoureusement. Ajouter de la soude (1 M) jusqu'à obtenir une solution limpide. Ajuster à 200 ml avec le tampon A.

Diluer 2 fois cette solution à l'eau distillée et ajuster le pH à 6,5.

Remarque : Le substrat se conserve 3 à 4 jours à 0°C.

La dilution du substrat doit être réalisée, le jour de son utilisation.

Mélange réactionnel :

Cuve blanc : 2,9 ml de tampon substrat (A)

Cuve essai : 2,9 ml de substrat

+ 50 μl d'extrait enzymatique

L'étude de la cinétique enzymatique de la LOX est réalisée pendant 5 à 10 minutes à 234 nm dans des cuves en Quartz, à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible double faisceau.

L'activité est donnée en $A_{234} \cdot \text{min}^{-1}$.

- Dosage de l'activité de la Phénylalanine Ammonia-Lyase (PAL)

La mesure de l'activité de la PAL est réalisée selon la méthode de Hodgins *et al.*, 1970 et d'après une méthode décrite par Martinez *et al.*, 1996, modifiée par Zhou *et al.*, 2003. Elle consiste à mesurer la quantité d'acide cinnamique libérée lors de la réaction de l'enzyme avec son substrat.

Préparations préalables :

Préparation du tampon :

Tampon borate (acide borique/solution de borax) à 0,1 M, pH 8,8, dans 200 mL

Solution A : Acide borique à 0,2 M

Peser 1,24 g d'acide borique et les mettre dans une fiole jaugée de 100 mL et agiter.

Solution B : Solution de borax Sigma à 0,05 M

Mettre 19,1 mL de solution de borax (0,131 M) dans une fiole jaugée de 50 mL et agiter.

Dans une fiole jaugée de 200 mL, mettre 50 mL de **solution A** et 30 mL de **solution B**.
Ajuster le pH à 8,8.

Préparation de la protamine sulfate de saumon à 5% :

Peser 0,5 g de protamine sulfate et les mettre dans 10 mL d'eau distillée. Agiter vigoureusement.

Remarque : La solution de protamine sulfate se conserve 24 h au réfrigérateur. Celle-ci doit être préparée le jour de son utilisation.

Précipitation de la PAL :

Ajouter de la protamine sulfate à l'extrait enzymatique, sous agitation douce pour obtenir une concentration finale en protamine sulfate de 1% par extrait.

Laisser incuber le mélange pendant 10 min à 4°C.

Centrifuger à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C puis récupérer le surnageant et le conserver à 4°C pour les mesures d'activités enzymatiques.

Préparation du substrat :

Pour un extrait donné, le substrat est réalisé avec 2,75 ml de tampon borate 0,1 M, pH 8,8 contenant 60 mM de L-phenylalanine, soit 0,027 g de L-phénylalanine pour 2,75 ml de tampon borate 0,1 M, pH 8,8. Pré-incuber le mélange à 40°C pendant 15min.

Remarque : La quantité de substrat à préparer est fonction du nombre d'extrait enzymatique à doser.

Mélange réactionnel :

Cuve blanc : 2,75 ml de tampon borate à 0,1 M, pH 8,8

+ 250 µl d'eau distillée

Cuve essai : 2,75 ml de tampon borate à 0,1 M, pH 8,8 contenant 60 mM de L-phenylalanine

+ 250 μ l d'extrait enzymatique

Cuve témoin : 2,75 ml de tampon borate à 0,1 M, pH 8,8

+ 250 μ l d'extrait enzymatique

(Pour chaque dosage d'activité, un témoin est réalisé)

Chaque mélange (blanc, essai et témoin essai) est mis à incuber à 40°C pendant **une heure** et les réactions sont stoppées par ajout de 0,1 ml de 6N HCl pour 1 ml de milieu considéré. L'absorbance est lue à longueur d'onde de 290 nm, dans des cuves en Quartz, à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible double faisceau. L'activité est donnée en $A_{290}.h^{-1}$.

Remarques :

- 1) L'incubation des mélanges pour le dosage de l'activité de la PAL se fait dans des tubes à hémolyse en plastique de 5 ml.
 - 2) Le blanc, l'essai et son témoin sont préparés en même temps.
 - 3) Durant la période d'incubation, la PAL réagit avec son substrat la L-phenylalanine et cette réaction libère de l'acide cinnamique. La quantité d'acide cinnamique libérée est ensuite mesurée à 290 nm. Il s'agit d'une lecture simple et non d'une cinétique comme pour les autres enzymes.
- Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD)

Le substrat ($O_2^{\cdot-}$) de la SOD est très instable et a une durée de vie très courte. Les méthodes de dosage sont donc indirectes. Le protocole de mesure a été mis au point d'après la méthode de Deschamps *et al.*, 1971, modifiée par Oberley *et al.*, 1985. Il évalue la SOD par sa capacité à inhiber un flux d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) généré par le système Xanthine-Xanthine Oxydase. Les radicaux superoxydes produits par ce système réduisent le nitrobleu de tétrazolium (NBT) en bleu de formazan stable à 560 nm.

Préparation du mélange réactionnel :

Préparation du réactif au NBT :

Pour une vingtaine de dosages, effectuer le mélange suivant :

- 2,4 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,8
- 39 ml de DETAPAC 1,33 mM

- 1,5 ml de NBT 2,24 mM
- 5,1 ml de xanthine 1,8 mM

Remarque : Réaliser ce réactif au moment de l'emploi.

Préparation de la solution diluée de xanthine-oxydase :

La solution commerciale de xanthine-oxydase sera diluée dans la solution de DETAPAC 1,33 mM ajustée à pH 7,8, à la dose 30 μ l de la solution commerciale pour 4,5 ml de solution de DETAPAC.

Remarque : Réaliser cette dilution juste avant l'expérimentation. Cette solution diluée doit être conservée dans de la glace.

Réduction du NBT :

Les mesures d'activité de la SOD sont menées à 560 nm dans des cuves PMMA, à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible double faisceau.

Cuve blanc : 2,4 ml de réactif au NBT

+ 0,6 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,8

Cuve référence : 2,4 ml de réactif au NBT

+ 100 μ l de solution de xanthine-oxydase diluée

+ 500 μ l de tampon phosphate 50 mM pH 7,8

Lire la DO pendant 8 minutes. L'activité est donnée en $A_{560} \cdot \text{min}^{-1}$ et représente **l'activité témoin**.

Remarque : La solution de xanthine-oxydase diluée est à ajuster de telle sorte que la pente obtenue se situe entre 0,015 et 0,025 $\Delta \text{DO} \cdot \text{min}^{-1}$.

Inhibition de la réduction du NBT par la SOD de l'extrait végétal :

Cuve essai : 2,4 ml de réactif au NBT

+ 100 μ l de solution de xanthine-oxydase diluée (~0,1 ml de solution)

+ 100 μ l d'extrait enzymatique (entre 5 et 40 μ l d'extrait)

+ 400 μ l de tampon phosphate 50 mM, pH 7,8

Lire la DO pendant 6 minutes. L'activité, donnée en $A_{560} \cdot \text{min}^{-1}$, représente **l'activité de l'extrait végétal avec la SOD**.

Remarque : Le volume d'extrait végétal est ajusté de telle sorte que l'inhibition constatée ne soit ni trop faible (0 %) ni trop forte (100 %).

Calcul du pourcentage d'inhibition :

$$\text{Inhibition par la SOD (\%)} = \frac{\text{pente témoin} - \text{pente extrait végétal}}{\text{pente témoin}} \times 100$$

Ce pourcentage permet d'évaluer l'activité de l'enzyme.

- Dosage de l'activité de la Glutathion-S-Transferase (GST)

La mesure de l'activité enzymatique de la GST a été inspirée de la méthode de Habig *et al.*, 1974. La GST catalyse une réaction de transfert du glutathion réduit (GSH) sur le CDNB (1-Chloro-2,4-Dinitrobenzène). Le produit de cette réaction absorbe à 340 nm, on visualise donc sa formation par spectrophotométrie pendant 10 minutes, dans des micro-cuves.

Préparations préalables :

Préparation du tampon :

Tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 0,1 M, pH 7 pour 100 ml : Cf. page 432 du DAWSON (Data for biochemical Research).

Préparation des substrats :

GSH à 100 mM : Dissoudre 0,15g de GSH dans 5 ml d'eau distillée.

CDNB à 100 mM : dissoudre 0,1 g de CDNB dans 5 ml d'éthanol absolue.

Mélange réactionnel :

Cuve blanc : 1 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7

+ 20 µl de GSH 100 mM

Laisser incubé à température ambiante 5 minutes.

+ 20 µl de CDNB 100 mM

Cuve essai : 0,5 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7

+ 0,5 ml d'extrait végétal

+ 20 µl de GSH 100 mM

Laisser incubé à température ambiante 5 minutes.

+ 20 μ l de CDNB 100 mM

L'étude de la cinétique enzymatique de la GST est réalisée pendant 5 à 10 minutes à 340 nm dans des micro-cuves, à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible double faisceau. L'activité est donnée en $A_{340} \cdot \text{min}^{-1}$.

f. Expression des résultats

1. Les critères de validation
2. les calculs
3. la limite de détection
4. l'incertitude des résultats
5. les auto-contrôles


g. Conditions de conservation et d'élimination des échantillons

h. Commentaire – Remarque

Noter dans ce paragraphe :

- les anomalies observables les plus courantes
- les conditions ou cas particuliers d'utilisation du Mode Opérateur

ANNEXE III

	NEMATOLOGIE	MODE OPERATOIRE	Date d'application : <i>Code : MO-TE-04 /NEMA</i> <i>Révision : 00</i>
	DOCUMENT QSE	EXTRACTION DE NEMATODES PAR ASPERSION	

Extraction de nématodes par aspersion
(Chambre à brouillard)

Désignation :	Rédaction	Vérification	Approbation
Nom :	Christiane Mauriol- Bastol	Patrick Quénéhervé	
Fonction :	Technicienne supérieure CQSE	Responsable laboratoire	Conseil de groupement du PRAM
Date :			
Signature			

Modification à l'origine de cette version :

Version initiale

Document : ☒ géré ☐ non géré

I. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode permet d'extraire les nématodes des tissus végétaux.

Avec cette méthode, les nématodes sont parfaitement préservés et vivants donc plus facile à identifier et peuvent être utilisés pour d'autres usages : fixation, ré infestation. Cette technique demande du temps, les résultats finaux ne sont pas obtenus avant 15 jours.

Ce mode opératoire est destiné aux chercheurs, techniciens, stagiaires, VCAT

II. PRINCIPE DE LA METHODE

Par l'action d'un brouillard d'eau sur un échantillon à analyser, les nématodes présents vont sortir d'eux-mêmes de cet échantillon, et seront ainsi récupérés.

III. DOCUMENTS ASSOCIES

- P-TE-01 / NEMA Réalisation des analyses
- I-M-02/NEMA Utilisation loupe binoculaire Wild MZ8
- I-M-03/NEMA Utilisation loupe binoculaire Wild M5A
- I-M-04/NEMA Utilisation microscope Leitz Diaplan
- I-M-05/NEMA Utilisation microscope LEICA DMLB
Carnet à souche type manifold

Ces documents se trouvent au laboratoire de nématologie salle 108

IV. ABREVIATIONS

°C : degré Celsius

µm : micromètre

cf. : confer

cm : centimètre

cm³ : centimètre cube

g : gramme

ml : millilitre

ml/mn : millilitre par minute

mm : millimètre

PVC : polychlorure de vinyle

R1 : première date de récupération (7 jours)

R2 : deuxième date de récupération (14 jours)

V. MOYENS EMPLOYES

Sa. Le matériel

Le matériel critique est identifié par (*)

- balance
- Boîtes de pétri (12 cm de diamètre)
- Bulleur
- Cellule de comptage de 5 ml
- Chambre à brouillard
- Couteaux, planche à découper
- Etuve
- Filtres de cellulose (Kleenex)
- Microscope ou loupe binoculaire
- Passoire à grosse maille
- Pipette
- Pissette à eau
- Quelques béchers de 250 cm³
- Quelques bouts de tuyaux plastiques 10 cm de longueur environ
- Quelques entonnoirs en plastique
- Quelques flacons en plastiques de 500 ml
- Quelques tamis artisanaux à grosse maille (PVC et toile moustiquaire, à fabriquer selon modèle)
- Quelques tubes de comptage gradués (25, 50, 100 ml)
- Trompe à vide

Ce matériel se trouve en salle 108 ,109 et salle de stockage au sous sol

1-Enregistrement des échantillons

Voir procédure P-TE-01 /NEMA

2-Technique

(La mise en œuvre de cette technique nécessite un accompagnement)

- Placer les racines dans la passoire et les laver à l'eau (jet puissant) pour les débarrasser de la terre adhérente. Découper les racines en petits morceaux d'environ 1 cm de longueur sur la planche à découper. Laver les morceaux de racines dans la passoire à l'eau courante en prenant la précaution de ne pas perdre les petites racines et bien homogénéiser l'ensemble. Sur un tamis à toile de moustiquaire, peser un poids convenu de racines (de 20 à 40g en fonction de la taille des racines)
- Placer ce tamis sur un entonnoir équipé à son extrémité d'un tuyau d'une dizaine de cm. Placer l'ensemble du dispositif sur le flacon de 500 ml équipé d'un trop plein de surface sur le support adapté dans la chambre à brouillard (1 minute de brouillard, 2 minutes de ressuyage).

- Au bout de 7 jours, on récupère le flacon contenant la suspension R1 avec son numéro d'échantillon que l'on remplace par un second flacon (un premier comptage sera effectué sur cette suspension R1).
- Après 2 heures de sédimentation, on pompe délicatement le trop-plein des flacons à l'aide d'une trompe à vide et la suspension de nématodes (inférieure en volume à 100 ml) est transférée directement dans un tube de comptage.
- Au bout de 14 jours, on récupère le flacon contenant la suspension R2 avec son numéro d'échantillon et l'on procède comme décrit ci-dessus.
- En fonction de la limpidité des suspensions de nématodes en R1 et R2, une filtration sur filtre de cellulose sera ou non envisagée. Pour ce faire, le contenu du tube sera délicatement renversé au dessus d'un tamis à grosse maille (PVC et toile moustiquaire) qui sert en fait de support à une double épaisseur de tissus de cellulose. Le tamis est ensuite posé au dessus d'un couvercle de boîte de Pétri et laissé au repos afin de récupérer les nématodes vivants dans une solution propre et limpide.
- Au bout de 24 heures, on récupère la solution dans un tube gradué à (100, 50, 25 ml) avant de procéder au comptage sur un aliquote de la solution à la dilution désirée.

3- Comptage

- Mettre un bulleur dans le tube pour remettre en suspension les nématodes
- Prélever 5 ml de cette suspension avec une pipette ; Mettre dans une cellule de comptage de 5 ml
- Compter tous les nématodes présents dans la cellule soit au microscope ou à la loupe : cf. I-M-02/NEMA, I-M-03/NEMA, I-M-04/NEMA, I-M-05/NEMA .

§f. Expression des résultats

1. les calculs :

Appliquer le facteur de dilution 20,10 ou 5

Les résultats des comptages après 7 et 14 jours sont rassemblés Les racines sont alors séchées à l'air ambiant, puis 24 heures dans une étuve à 50 °C avant d'être délicatement pesées. On note le poids des racines sèches, on peut ainsi après calcul rapporter le nombre de nématode par gramme de racines fraîches ou sèches.

§g. Conditions de conservation et d'élimination des échantillons

Les échantillons sont conservés environ 1 semaine pour contrôle le cas échéant. Puis ils sont éliminés par le circuit normal des déchets ménagers.

§h. Commentaires - Remarques




Chambre à brouillard



Echantillon

ANNEXE IV

	LABORATOIRE NEMATOLOGIE	MODE OPERATOIRE	Date d'application : <i>Code : MO-TE-07/NEMA</i> <i>Révision : 00</i>
	DOCUMENT QSE	<i>EXTRACTION DE NEMATODES SUR GAINE DE TERRE (ANANAS)</i>	

**EXTRACTION DE NEMATODES SUR GAINE DE TERRE
(ANANAS)**

Désignation :	Rédaction	Vérification	Approbation
Nom :	C. Mauriol-Bastol	P. Quénéhervé	
Fonction :	Technicienne supérieure CQSE	Responsable laboratoire	Conseil de groupement du PRAM
Date :			
Signature			

Modification à l'origine de cette version :

Version initiale

Document : ☒ **géré** ☐ **non géré**

I. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire permet de déterminer les différentes étapes de l'extraction de nématodes sur gaine de terre, culture d'ananas.

Il s'adresse aux chercheurs, techniciens, VCAT et stagiaires.

II. PRINCIPE DE LA METHODE

Récupération des nématodes contenus dans la terre qui entoure les racines après arrachage du plan. Car la plupart des nématodes de l'ananas sont des ectoparasites et des semi-endoparasites (les femelles matures de *Rotylenchulus* n'ont que le cou engagé dans les racines).

III. DOCUMENTS ASSOCIES

- Enregistrement : E-TE-04/NEMA 'Bon de commande'
- Feuille de calcul
- Extraction par centrifugation flottaison MO-TE-01/NEMA
- Réalisation des analyses P-TE-01/NEMA
- Utilisation Centrifugeuse MO-TE-
- Registre Extraction par centrifugation flottaison

IV. ABREVIATIONS

ml: millilitre

Cf. : confer

V. MOYENS EMPLOYES

a. Le matériel

Le matériel critique est identifié par un « * »

- Pelle-bêche
- Couteaux
- Sacs plastique de 10 L
- Gants
- Etiquettes
- Seaux
- Passoire
- Balance
- Papier type sopalin
- Colonne de tamis (25, 32, 50, 80,250 microns)
- Godets de centrifugation

b. Les réactifs

Cf. MO-TE-01/NEMA

c. Consignes de sécurité spécifique

Néant

d. Etalon et Calibrage

Cf. MO-TE-01/NEMA

e. Processus Opératoire

Le prélèvement

Pour avoir un échantillon représentatif de la parcelle, une vingtaine de plants d'ananas seront prélevés :

- Arracher complètement le plant à l'aide d'une pelle bêche pour récupérer les racines avec la terre
- Couper les racines, mettre dans un sachet de 10 litres, identifier le prélèvement à l'aide d'une étiquette
- Porter le prélèvement au laboratoire

Traitement de l'échantillon

Préparation de l'échantillon

- Prendre la souche d'ananas, la secouer afin de faire tomber la grosse terre
 - Récupérer les racines avec la gaine de terre puis les peser
 - Mettre les racines dans une passoire posée sur un seau les laver soigneusement pour libérer la gaine de terre
 - Répéter l'opération sur plusieurs seaux si nécessaire, jusqu'à l'obtention d'une eau presque claire
 - Sécher les racines dans du papier type sopalin les peser (par différence de pesée on obtiendra le poids de la gaine de terre pour les calculs)
 - Faire passer le sumageant des différents seaux, en commençant par celui le moins chargé en terre sur une colonne de tamis rangés de bas en haut (25, 32, 50, 80, 250 microns)
 - Récupérer le contenu des tamis 80, 50, 32, et 25 dans un godet de centrifugation
 - Sur le godet procéder à une extraction de nématodes par centrifugation flottaison
- MO-TE-01/NEMA

f. Expression des résultats

1. Les critères de validation :

Néant

2. les calculs :

Le comptage est fait sur un volume de 1 ml

L'extraction est faite sur un poids de terre **P** obtenu par la différence de poids en pesant les racines avant et après lavage

La suspension est amenée à **50** ml soit **X** le nombre de nématodes trouvés dans 1 ml

Le nombre **N** de nématodes pour **100** g de gaine de terre est égal à :

$$N = \frac{X \cdot 50}{1 \cdot P} \cdot 100$$

3. la limite de détection :
Néant

4. l'incertitude des résultats :
Néant

5. les autocontrôles :
Néant

g. Conditions de conservation et d'élimination des échantillons

Ne pas exposer les échantillons au soleil ni à la chaleur d'un coffre de voiture, les transférer le plus rapidement possible au laboratoire.

Les échantillons peuvent être conservés en chambre froide une semaine

h. Commentaires- Remarques

Analyse de la conformité au laboratoire : observation visuelle de l'échantillon.

Ces échantillons subissant une extraction par centrifugation flottaison, ils sont enregistrés sur le registre « Extraction par centrifugation flottaison » selon la procédure P-TE-01/NEMA.

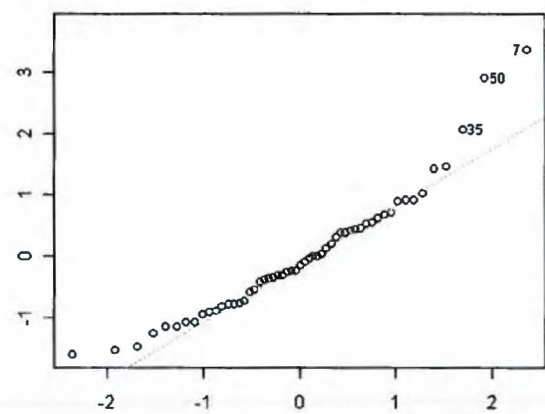
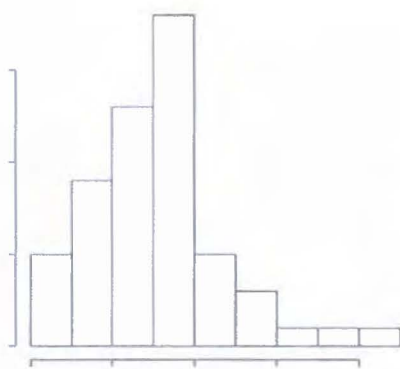
ANNEXE V

ETUDE STATISTIQUE NEMATODES BANANE 902 :

```
> summary(datas)
```

Variété	Traitement	répétition	mâles.gderacines	femelle.gderacines	juvéniles.gderacines	total	
D902:55	LAH	: 7	1:8	Min. : 31.09	Min. : 0.00	Min. : 190.5	Min. : 223.8
	MEJA	: 7	2:8	1st Qu.:106.39	1st Qu.: 43.27	1st Qu.: 399.5	1st Qu.: 560.7
	P	: 7	3:8	Median :158.27	Median : 81.76	Median : 558.8	Median : 832.8
	P+TR+S	: 7	4:8	Mean :158.96	Mean :144.24	Mean : 682.1	Mean : 985.3
	SA	: 7	5:8	3rd Qu.:194.62	3rd Qu.:173.40	3rd Qu.: 906.8	3rd Qu.:1285.2
	T-	: 7	6:8	Max. :436.62	Max. :782.22	Max. :2084.5	Max. :3104.8
	(Other)	:13	7:7				

Distribution de malepargderacines :



→Distribution normale.

Test Shapiro :

Shapiro-Wilk normality test

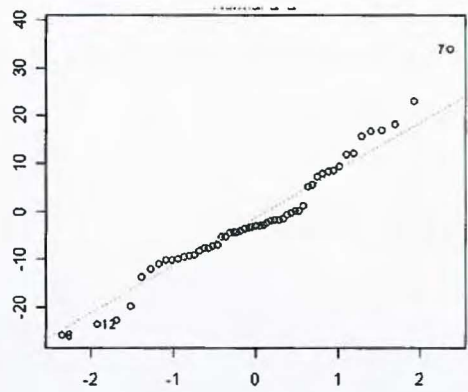
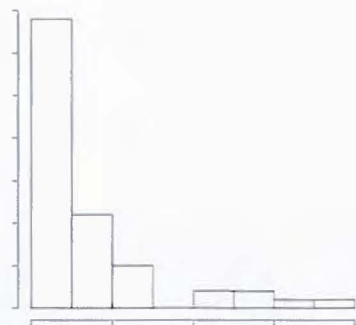
```
data: datas[datas$Variété == "D902", ]$mâlepargderacines
W = 0.9446, p-value = 0.01230
```

→ANOVA

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi)
NULL			55	379478	
Traitement	7	42446	48	337032	0.6133
répétition	6	5852	42	331180	0.9935

Pas d'effet traitement, ni d'effet repetition.

Distribution femellepargderacines:



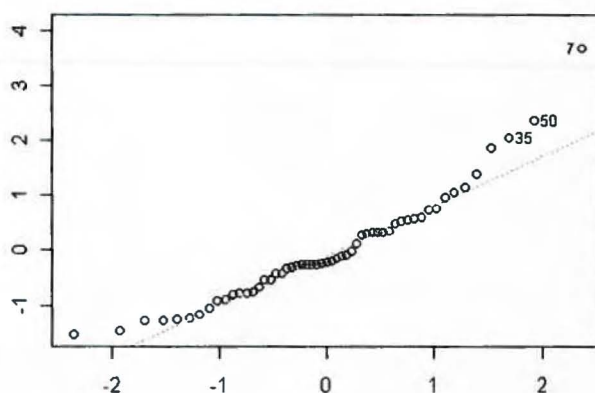
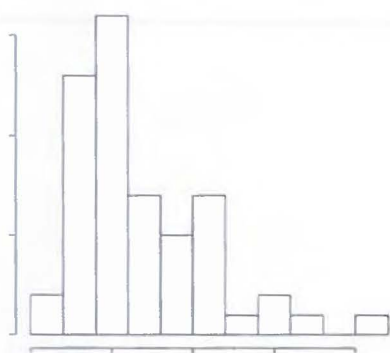
→ Suit une loi Poisson

→ ANOVA

```
      Df Deviance Resid. Df Resid. Dev P(>|Chi|)
NULL                                55      8610.9
Traitement  7  3088.99           48      5521.9 < 2.2e-16 ***
répétition  6   264.31           42      5257.6 < 2.2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Il y a un effet traitement et un effet repetition.

Distribution des juvéniles :



Shapiro-Wilk normality test

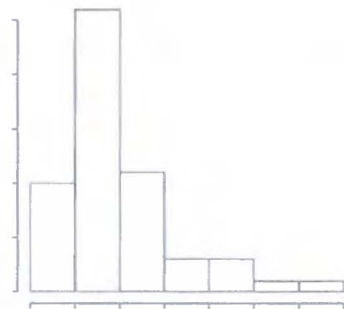
```
lata: datas[datas$Variété == "D902", ]$juvénilespargderacines
W = 0.8865, p-value = 8.739e-05
```

ANOVA :

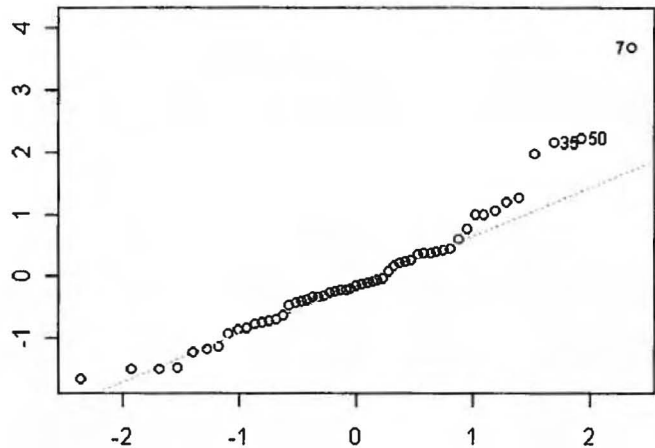
```
      Df Deviance Resid. Df Resid. Dev P(>|Chi|)
NULL                                54      8764837
Traitement  7  1191437           47      7573400    0.4785
répétition  6   102044           41      7471357    0.9970
```

Pas d'effet traitement ni répétition.

DISTRIBUTION DU TOTAL :



Suit une loi normale



Shapiro-Wilk normality test

```
data: datas[datas$Variété == "D902", ]$total
W = 0.8705, p-value = 2.719e-05
```

ANOVA :

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				54		20958063	
Traitement	7	3334266		47		17623798	0.3387
répétition	6	387436		41		17236362	0.9884

Ni effet traitement, ni effet répétition.

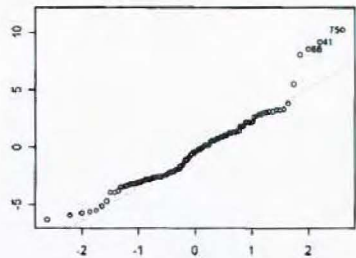
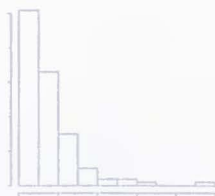
Tableau récapitulatif :

	traitement	Répétition	Distribution
Male	Non	Non	Normale
Femelle	Oui	Oui	Poisson
Juvéniles	Non	Non	Normale
total	non	non	Normale

ETUDE NEMATO ANANAS :

```
> summary(datas)
variété   traitement répétition adulte pargdegainedeterre œuf pargdegainedeterre
CAY:55    LAM       :14      1:16      Min.   : 0.000           Min.   : 0.000
MD2:55    MEJA      :14      2:16      1st Qu.: 5.587           1st Qu.: 4.901
          P+TR+S    :14      3:16      Median :10.833          Median :11.711
          S         :14      4:16      Mean    :14.779          Mean    :16.392
          SA        :14      5:16      3rd Qu.:19.462          3rd Qu.:20.798
          T-        :14      6:16      Max.    :90.090          Max.    :126.126
(Other):26 7:14
```

ADULTES PAR G DE GAINÉ DE TERRE POUR MD2 ET CAY :



Suit une loi de Poisson (distribution des adultes pour MD2 et CAY)

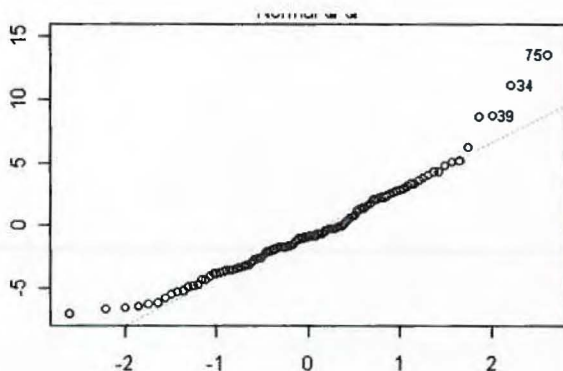
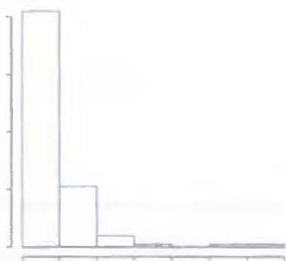
ANOVA :

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi)
NULL			109	1102.24	
traitement	7	132.128	102	970.11	< 2.2e-16 ***
répétition	1	1.179	101	968.93	0.277495
variété	1	9.483	100	959.45	0.002074 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Il y a un effet traitement et un effet variété. Il n'y a pas d'effet répétition.

Distribution des œufs :



Suit une loi Poisson

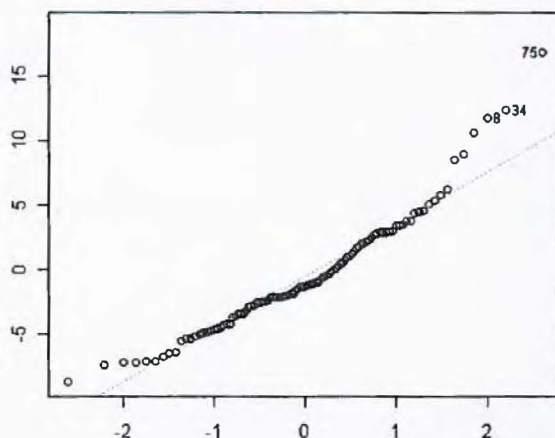
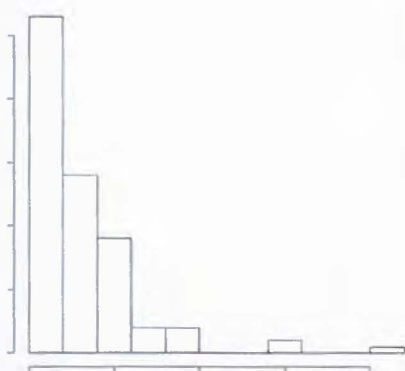
ANOVA :

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi)
NULL			109	1735.0	
traitement	7	283.673	102	1451.4	< 2.2e-16 ***
répétition	1	15.870	101	1435.5	6.784e-05 ***
variété	1	11.222	100	1424.3	0.0008082 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Il y a un effet traitement, un effet répétition et un effet variété.

Distribution du total :



Suit une loi Poisson

ANOVA :

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi)
NULL			109	2439.2	
traitement	7	390.74	102	2048.4	< 2e-16 ***
répétition	1	4.56	101	2043.9	0.03274 *
variété	1	0.09	100	2043.8	0.75794

Signif. codes:	0	****	0.001	***	0.01 **
					0.05 .
					0.1 ' ' 1

Il y a un effet traitement et un effet répétition.

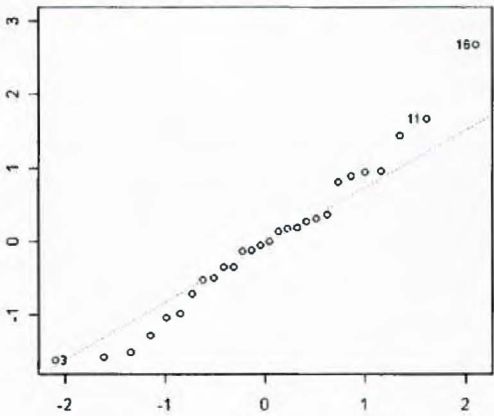
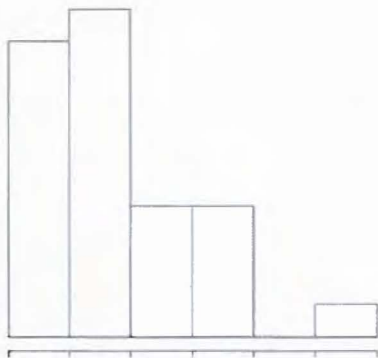
Tableau récapitulatif :

	Traitement	Répétition	Variété	Distribution
Adultes	Oui	Non	Oui	Poisson
Œufs	Oui	Oui	Oui	Poisson
Total	oui	oui	Non	Poisson

ETUDE STATISTIQUE BAN902 SPLIT ROOT

> summary(datas)							
Essai	variété	traitement	enzyme	répétition	activitéenzymatique		
Min. :2	D902:224	LAM :32	APX :28	1:56	Min. :	-1.0575	
1st Qu.:2		MEJA :32	CAT :28	2:56	1st Qu.:	-0.1639	
Median :2		P :32	GST :28	3:56	Median :	2.8000	
Mean :2		P+TR+S:32	LOX :28	4:56	Mean :	404.4146	
3rd Qu.:2		S :32	PAL :28		3rd Qu.:	286.4286	
Max. :2		SA :32	POD :28		Max. :	9391.6667	
		TR :32	{Other}:56		NA's :	7.0000	

Distribution de la LOX :



```
> shapiro.test(datas[datas$enzyme=="LOX",]$activitéenzymatique)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data:  datas[datas$enzyme == "LOX", ]$activitéenzymatique
W = 0.8784, p-value = 0.003699
```

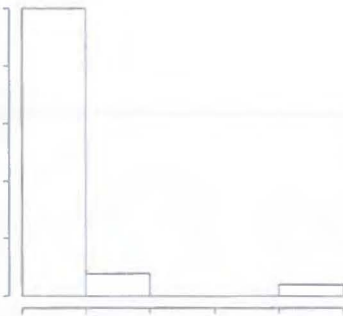
→ANOVA :

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi)
NULL			27	1026.61	
traitement	6	602.91	21	423.70	4.041e-05 ***
répétition	3	61.18	18	362.51	0.3858

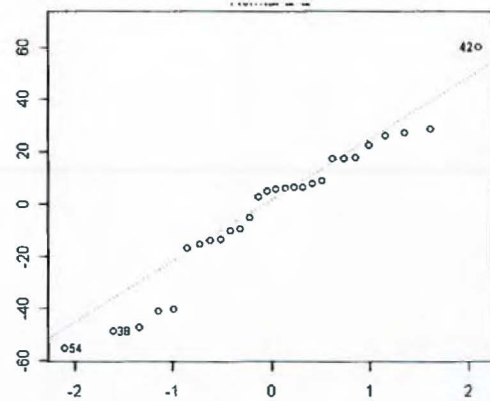
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Un effet traitement et pas d'effet répétition.

Distribution de la POD :



Suit une loi Poisson.



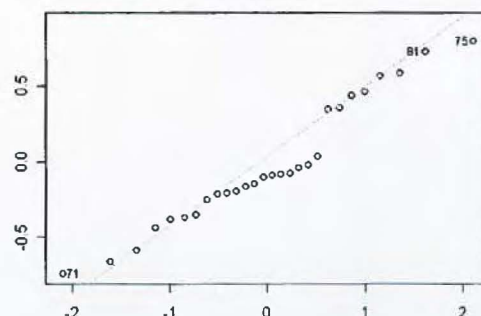
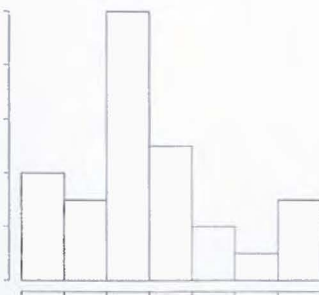
→ANOVA :

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi)
NULL			27	32573	
traitement	6	11407	21	21166	< 2.2e-16 ***
répétition	3	11287	18	9879	< 2.2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Il y a un effet traitement et un effet répétition.

Distribution de la PAL :



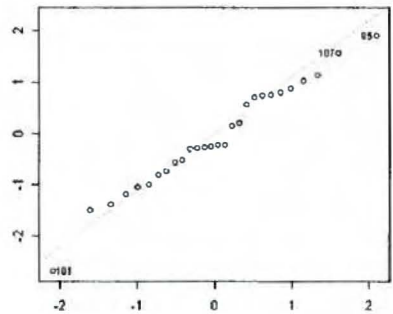
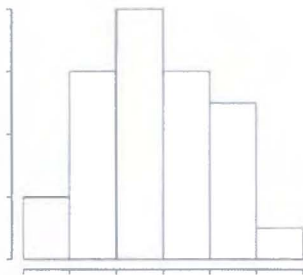
Suit une loi normale.

→ANOVA :

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				27		3.2362	
traitement	6	0.45373		21		2.7824	0.7572
répétition	3	0.38062		18		2.4018	0.4149

Aucun effet traitement, ni répétition.

Distribution de la SOD :



Suit une loi normale.

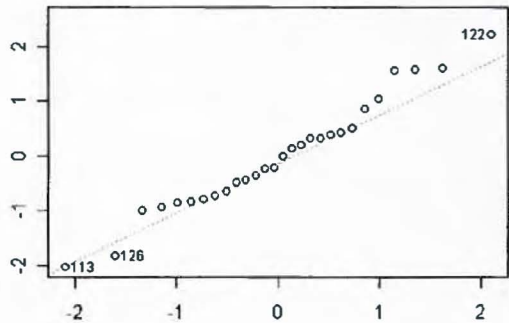
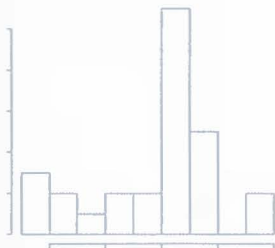
→ANOVA :

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				27		10919666	
traitement	6	3832289		21		7087377	0.03172 *
répétition	3	2095816		18		4991561	0.05609 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Il y a un effet traitement et un effet répétition.

Distribution de l'APX :



Suit une loi normale.

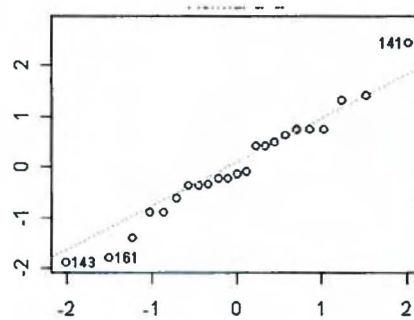
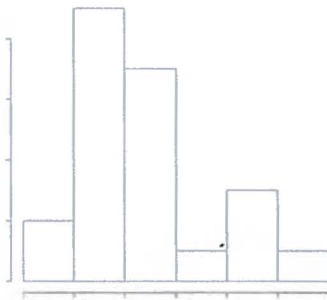
→ANOVA

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi)
NULL			27	1.32998	
traitement	6	0.79018	21	0.53981	0.0001162 ***
répétition	3	0.02277	18	0.51704	0.8512370

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Il y a un effet traitement et pas d'effet répétition.

Distribution de la GST :



```
> shapiro.test(datas[datas$enzyme=="GST",]$activitéenzymatique)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data:  datas[datas$enzyme == "GST", ]$activitéenzymatique
W = 0.8996, p-value = 0.0248
```

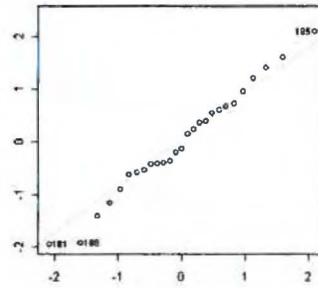
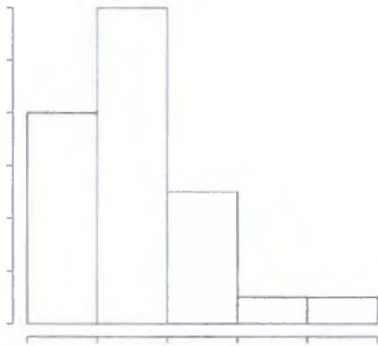
→ANOVA :

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi)
NULL			22	0.34932	
traitement	6	0.115106	16	0.23421	0.13737
répétition	3	0.080116	13	0.15409	0.07999 .

 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Il y a ni effet traitement ni effet répétition.

Distribution de la PPOX :



Suit une loi normale.

```
> shapiro.test(datas[datas$enzyme=="PPOX",]$activitéenzymatique)
```

Shapiro-Wilk normality test

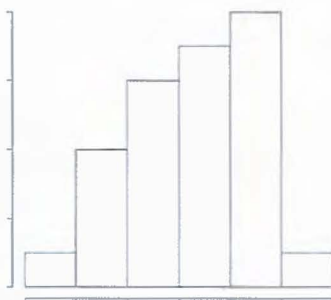
```
data:  datas[datas$enzyme == "PPOX", ]$activitéenzymatique
W = 0.8939, p-value = 0.009731
```

→ANOVA :

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				26		573.27	
traitement	6	288.099		20		285.17	0.002250 **
répétition	3	46.329		17		238.84	0.347981

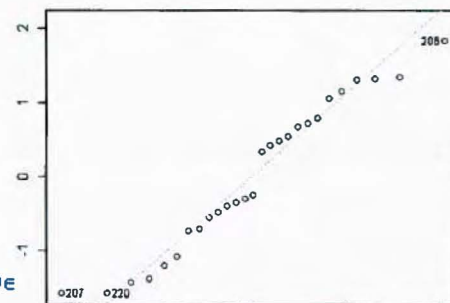
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Il y a un effet traitement et pas d'effet répétition.



Distribution de la CAT :

Suit une loi normale.



→ANOVA

	Df	De	P(> Chi)
NULL			
traitement	6	0.14051	0.0114499 *
répétition	3	0.13985	0.0009426 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Il y a un effet traitement et un effet répétition.

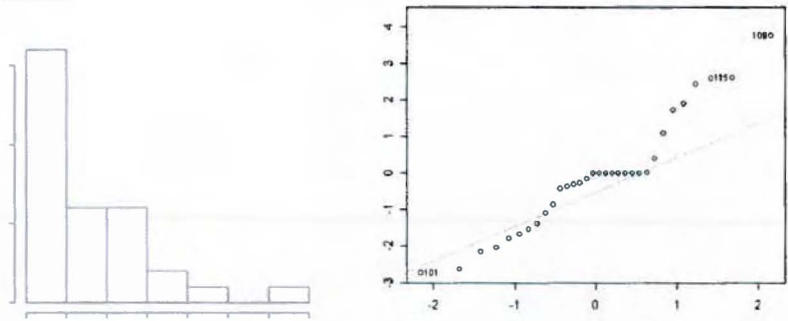
ETUDE STATISTIQUE BANANIER 902 SERRE :

> summary(datas)

Essai	variété	traitement	enzyme	répétition	activitéenzymatique
Min. :1	D902:257	P+TR+S :33	POD :33	1:65	Min. : -0.954
1st Qu.:1		LAM :32	APX :32	2:64	1st Qu.: 0.284
Median :1		MEJA :32	CAT :32	3:64	Median : 7.096
Mean :1		P :32	GST :32	4:64	Mean : 260.485
3rd Qu.:1		S :32	LOX :32		3rd Qu.: 61.184
Max. :1		SA :32	PAL :32		Max. :8210.000
		(Other):64	(Other):64		NA's : 48.000

Figure 15 : Résumé données 902

LOX



Suit une loi Poisson

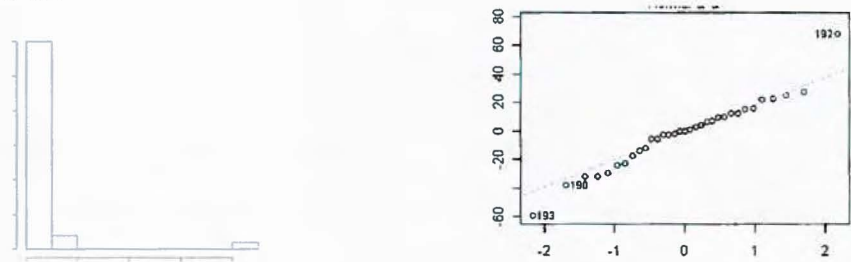
→ANOVA

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)				
NULL				31		303.371					
traitement	7	248.986		24		54.385	<2e-16 ***				
répétition	3	5.475		21		48.910	0.1401				

Signif. codes:	0	***	0.001	***	0.01	**	0.05	.	0.1	.	1

Il y un effet traitement et pas d'effet répétition.

POD



→Suit une loi de Poisson

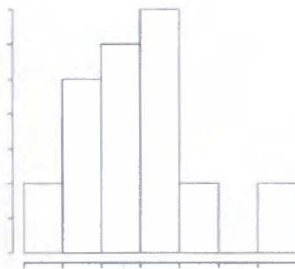
→ANOVA :

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL			32		33220		
traitement	7	14299	25		18921	< 2.2e-16	***
répétition	3	10421	22		8500	< 2.2e-16	***

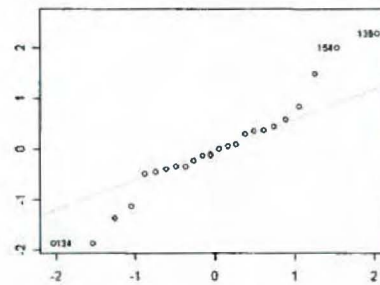
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Il y a un effet traitement et un effet répétition.

PAL :



Suit une loi normale.



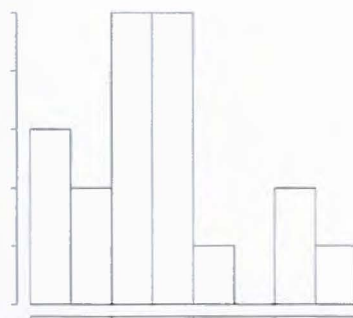
→ANOVA :

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL			23		2.05923		
traitement	7	0.99142	16		1.06781	0.04312	*
répétition	2	0.10994	14		0.95787	0.44780	

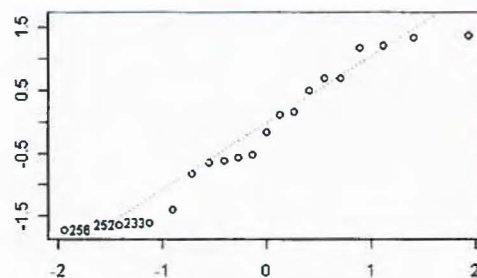
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Il y a un effet traitement et pas d'effet répétition.

SOD :



→Suit une loi

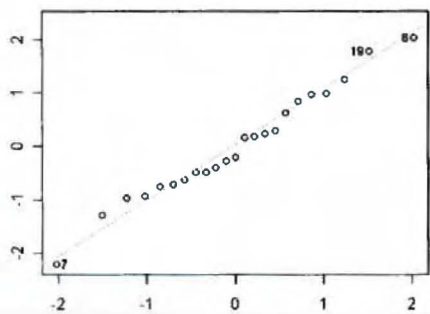
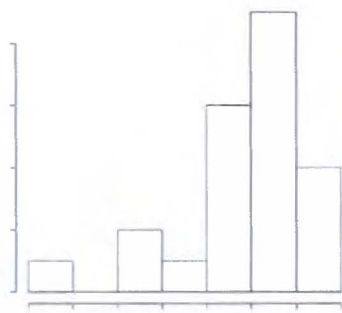


→ANOVA :

Pas d'effet traitement mais un effet répétition.

		Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)				
APX	NULL				18		10.2518					
	traitement	7	4.1776		11		6.0742	0.060131 .				
	répétition	2	3.1126		9		2.9616	0.006463 **				

	Signif. codes:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*'	0.05	'.'	0.1	' '	1



Suit une loi normale.

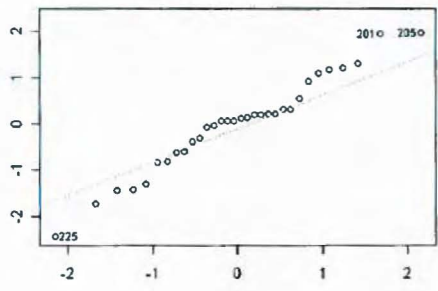
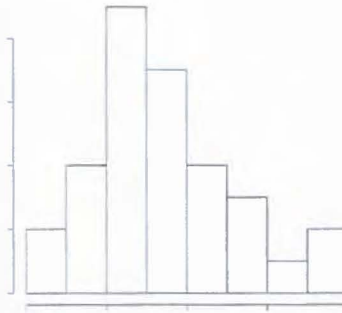
→ANOVA

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)				
NULL				22		0.46145					
traitement	7	0.10088		15		0.36057	0.454147				
répétition	2	0.16660		13		0.19397	0.003761 **				

Signif. codes:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*'	0.05	'.'	0.1	' '	1

Pas d'effet traitement mais un effet répétition.

PPOX :



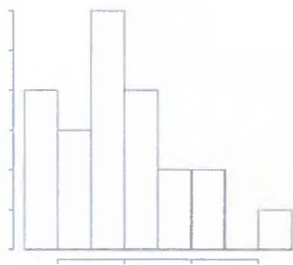
→ANOVA :

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)					
NULL				31		2662.60						
traitement	7	465.01		24		2197.58	0.1924					
répétition	3	1214.55		21		983.03	9.79e-06 ***					

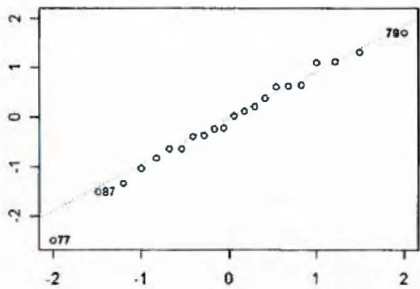
Signif. codes:	0	****	0.001	***	0.01	**	0.05	.	0.1	.	.	1

Il y a un effet répétition et pas d'effet traitement.

GST :



Suit une loi Gamma



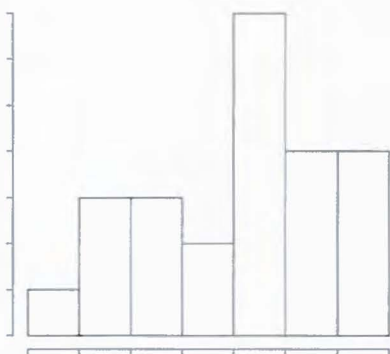
→ANOVA :

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)					
NULL				21		5.4082						
traitement	7	2.99613		14		2.4121	0.0008352 ***					
répétition	3	0.94483		11		1.4673	0.0501161 .					

Signif. codes:	0	****	0.001	***	0.01	**	0.05	.	0.1	.	.	1

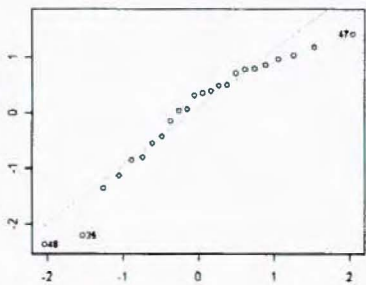
Il y a un effet traitement et un effet répétition.

CAT :



→Suit une loi normale

→ANOVA



	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				23		0.62884	
traitement	7	0.145147		16		0.48369	0.7409
répétition	2	0.014523		14		0.46917	0.8052

Ni effet traitement, ni effet répétition.

Tableau récapitulatif :

Enzyme	Loi	Effet traitement	Effet répétition
LOX	Poisson	Oui	Non
POD	Poisson	Oui	Oui
PAL	Normale	Oui	Non
SOD	Normale	Non	Oui
APX	Normale	Non	Oui
GST	Gamma	Oui	Oui
PPOX	Normale	non	oui
CAT	Normale	non	non

ANANAS MD2 ET CAY :

Résumé :

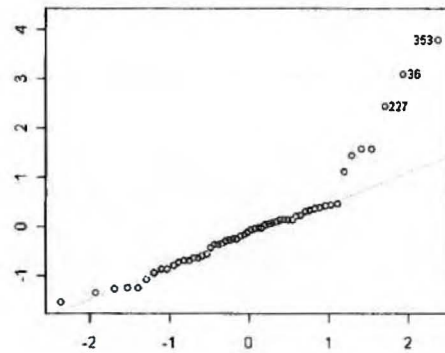
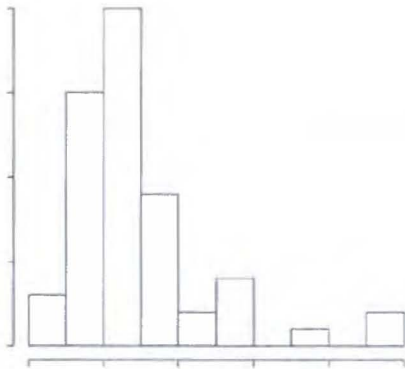
Terms added sequentially (first to last)

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				23		0.62884	
traitement	7	0.145147		16		0.48369	0.7409
répétition	2	0.014523		14		0.46917	0.8052

```
> summary(datas)
```

Essai	variété	traitement	enzyme	répétition	activitéenzymatique
Min. :1	CAY:256	LAM : 64	APX : 64	1:128	Min. : -41.7696
1st Qu.:1	MD2:256	MEJA : 64	CAT : 64	2:128	1st Qu.: 0.0000
Median :1		P : 64	GST : 64	3:128	Median : 0.4976
Mean :1		P+TR+S : 64	LOX : 64	4:128	Mean : 254.7516
3rd Qu.:1		S : 64	PAL : 64		3rd Qu.: 69.2600
Max. :1		SA : 64	POD : 64		Max. : 3637.2549
		(Other):128	(Other):128		NA's : 79.0000

LOX :



→ Suit une loi normale.

Test Shapiro Wilk : $p\text{-value} = 1,62 \cdot 10^{-7}$

→ ANOVA

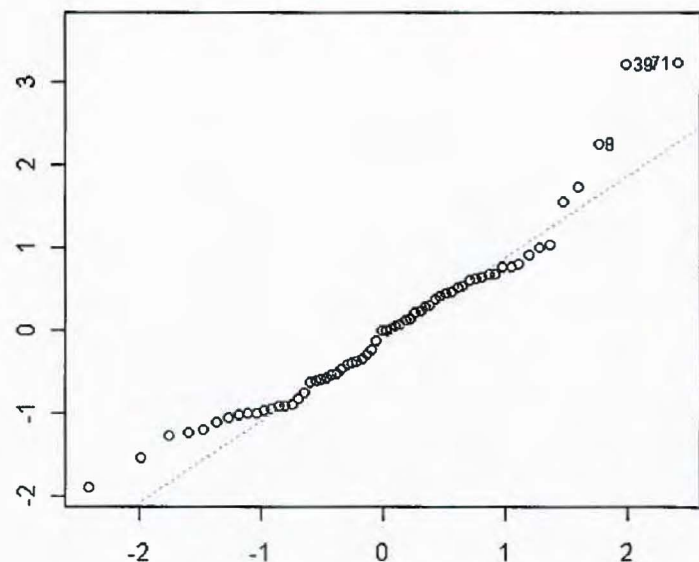
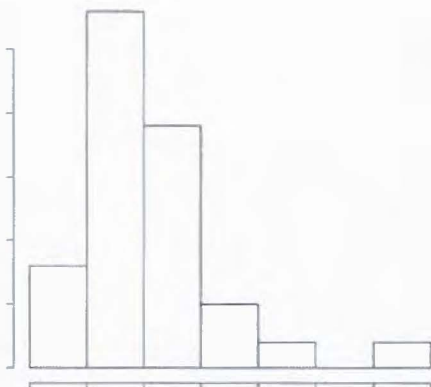
	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi)
NULL			55	4781.9	
traitement	7	1057.43	48	3724.5	0.06393 .
répétition	3	94.57	45	3629.9	0.75438
variété	1	145.88	44	3484.0	0.17469

Effet traitement : $p\text{-value} > 0,05$ → pas d'effet traitement

Effet répétition : $p\text{-value} > 0,05$ → il y a un effet répétition

Effet variété : $p\text{-value} > 0,05$ → pas d'effet variété

POD :



→ Suit une loi Normale

Test de Shapiro Wilk : $p\text{-value} = 1,47 \cdot 10^{-5}$

→ ANOVA

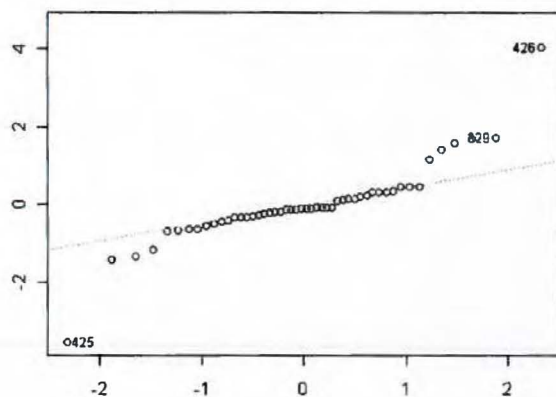
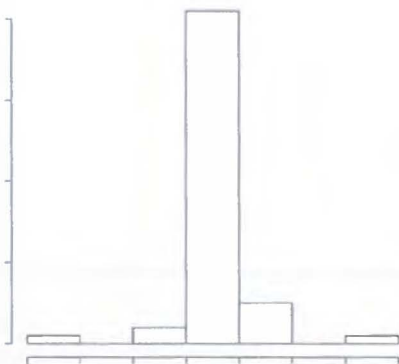
	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi)
NULL			63	220737	
traitement	7	28614	56	192123	0.213205
répétition	3	34098	53	158025	0.009639 **
variété	1	2823	52	155202	0.330791

Effet traitement : $p\text{-value} > 0,05 \rightarrow$ pas d'effet traitement

Effet répétition : $p\text{-value} < 0,05 \rightarrow$ il y a un effet répétition

Effet variété : $p\text{-value} > 0,05 \rightarrow$ pas d'effet variété

PAL :



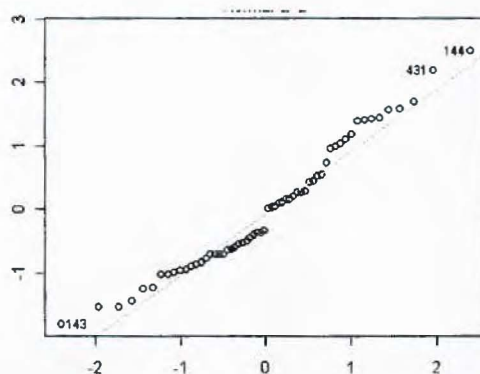
\rightarrow Suit une loi normale

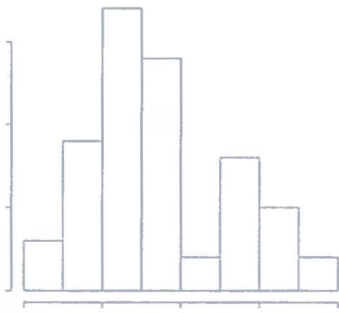
\rightarrow ANOVA

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi)
NULL			49	12636	
traitement	7	285.49	42	12350	0.9937
répétition	3	1548.72	39	10802	0.1223
variété	1	635.68	38	10166	0.1232

Aucun effet.

SOD :





→ Suit une loi normale

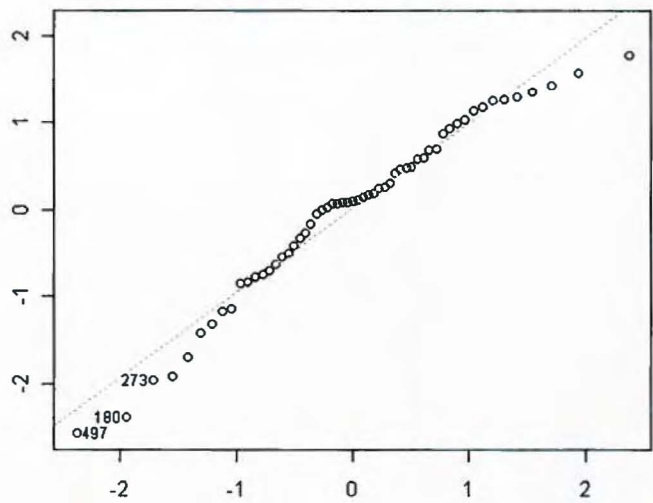
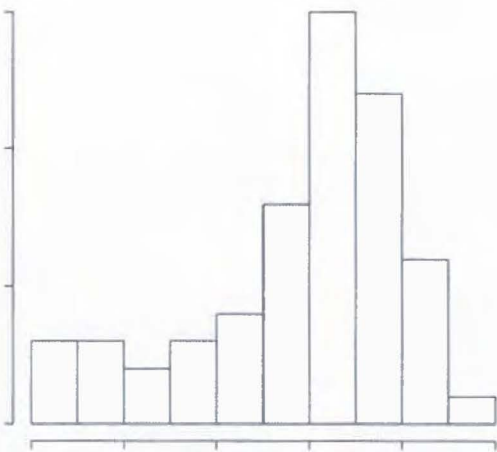
Test Shapiro Wilk : p-value = 0,006

→ ANOVA

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				59		48352705	
traitement	7	6891228		52		41461477	0.160977
répétition	3	9921820		49		31539657	0.001696 **
variété	1	96348		48		31443309	0.701341

Pas d'effet traitement ni variété. Y a un effet répétition.

APX :



→ Suit une loi normale

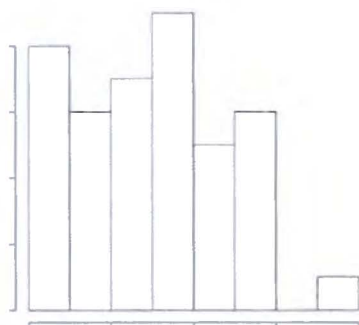
Test de Shapiro Wilk : p-value = 0,0004

→ ANOVA

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				56		2.8123	
traitement	7	0.48855		49		2.3237	0.12149
répétition	3	0.39751		46		1.9262	0.02569 *
variété	1	0.00033		45		1.9259	0.93041

Aucun effet traitement, ni variété. Il y a un effet répétition.

GST :



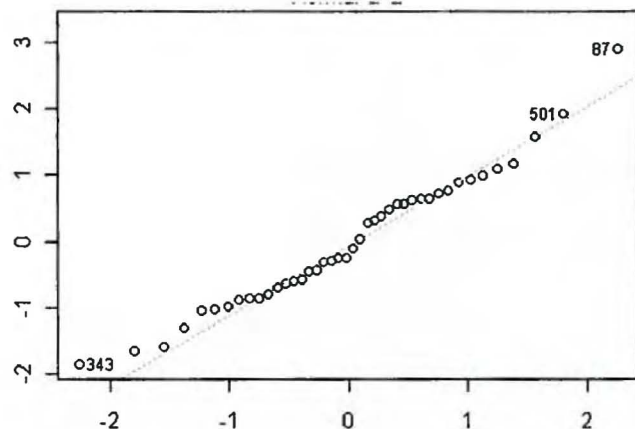
→ Suit une loi normale

→ ANOVA

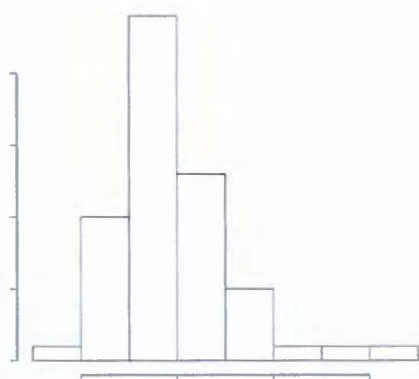
	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				41		1.51890	
traitement	7	0.25718		34		1.26172	0.1148566
répétition	3	0.42457		31		0.83715	0.0002564 ***
variété	1	0.17150		30		0.66566	0.0054337 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Un effet répétition et variété, pas d'effet traitement.



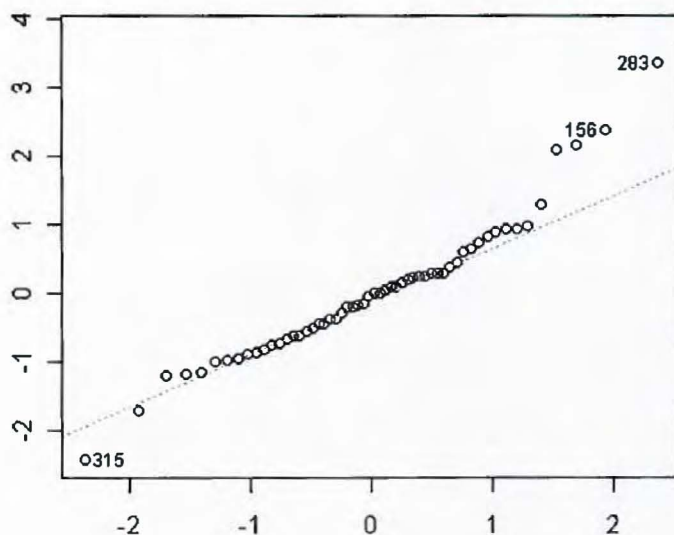
PPOX



→ Suit une loi normale

Test de Shapiro Wilk : p-value = 0,0001

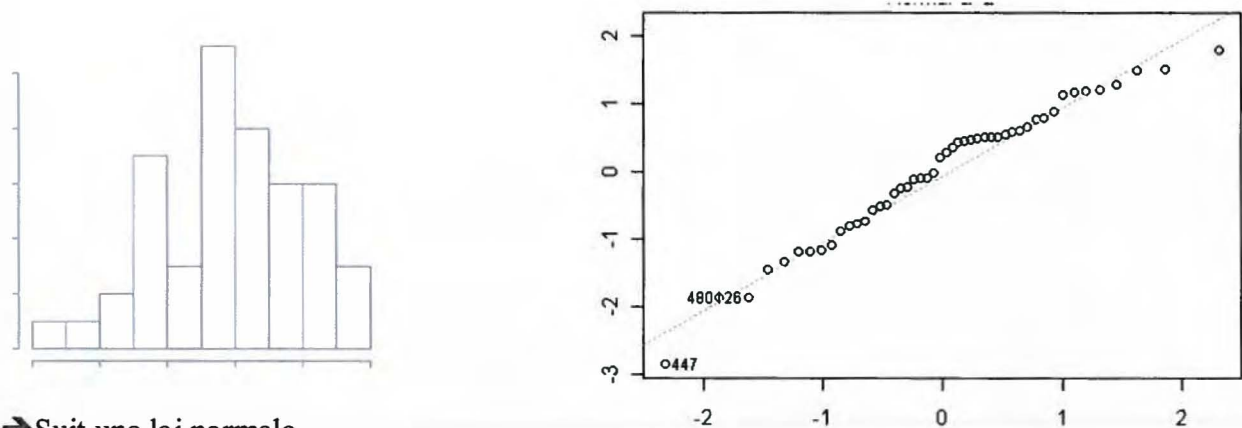
→ ANOVA



	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				55		0.80248	
traitement	7	0.182028		48		0.62046	0.04373 *
répétition	3	0.028579		45		0.59188	0.51854
variété	1	0.037605		44		0.55427	0.08403 .

Il y a un effet traitement, pas d' effet repetition. Pas d'effet variété.

CAT :



→Suit une loi normale

→ANOVA

	Df	Deviance	Resid.	Df	Resid.	Dev	P(> Chi)
NULL				47		54.023	
traitement	7	12.5035		40		41.519	0.045428 *
répétition	2	8.5193		38		33.000	0.007552 **
variété	1	0.7423		37		32.258	0.356161

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1							

Un effet traitement, un effet répétition et pas d' effet variété.

TABLEAU RECAPITULATIF :

Enzyme	Loi	Effet traitement	Effet répétition	Effet variété
LOX	Normale	Non	Non	Non
POD	Normale	Non	Oui	Non
PAL	Normale	Non	Non	NON
SOD	Normale	Non	Oui	Non
APX	Normale	Non	Oui	Non
GST	Normale	non	oui	oui
PPOX	Normale	Oui	Non	non
CAT	Normale	oui	oui	non

